



HAL
open science

Caractérisation du site de liaison du cholestérol sur l'APP : un modulateur de la sécrétion de peptides amyloïdes

Linda Hanbouch

► **To cite this version:**

Linda Hanbouch. Caractérisation du site de liaison du cholestérol sur l'APP : un modulateur de la sécrétion de peptides amyloïdes. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066090 . tel-02002938

HAL Id: tel-02002938

<https://theses.hal.science/tel-02002938>

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

Institut du Cerveau et de la moelle épinière

Equipe Maladie d'Alzheimer et maladies à prions

Caractérisation du site de liaison du cholestérol sur l'APP : un modulateur de la sécrétion de peptides amyloïdes.

Par Linda Hanbouch

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Dr. Marie-Claude Potier

Présentée et soutenue publiquement le 30 Janvier 2017

Devant un jury composé de :

Pr. Jean-Noël Octave

Rapporteur

Dr. Catherine Malaplate-Armand

Rapporteur

Dr. Bernadette Allinquant

Examineur

Dr. Sandrine Betuing

Examineur

Dr. Guillaume Dorothée

Examineur

Dr. Isabelle Dusart

Président

Dr. Marie-Claude Potier

Directrice de thèse

*« Pas de patience,
pas de science. »*

Jean-Pierre Jarroux

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier le Docteur Isabelle Dusart d'avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Noël Octave et le Docteur Catherine Malaplate-Armand d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Merci encore pour vos remarques faites sur le mémoire.

Je remercie également le Docteur Bernadette Allinquant, le Docteur Sandrine Betuing et le Docteur Guillaume Dorothée d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail de thèse. Je remercie plus particulièrement le Docteur Sandrine Betuing pour ses explications portant sur la culture primaire de neurones. Je remercie Guillaume Dorothée pour ses conseils lors de la reunion du comité de mi- thèse.

Un grand merci aux docteurs Caroline Louis et Mark Millan, encadrants scientifiques du groupe pharmaceutique SERVIER, pour le soutien financier qu'ils ont accordé à ce projet, pour leur conseil et leur disponibilité tout au long de ces trois ans.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, le Docteur Marie-Claude Potier pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe en master 2 et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour son encadrement, sa disponibilité, son savoir-faire, son indulgence, ses conseils et les nombreux enseignements que j'ai tirés de nos échanges.

Je remercie énormément nos collaborateurs de l'Institut d'Optique, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci à Mickael Canva, Julien Moreau et Karen Perronet. Merci à Alexandra Sereda et Aurore Olivero pour leur participation et leur aide. Merci à Julien Moreau pour tous ces échanges et surtout ta bonne humeur !

Je remercie sincèrement tous les membres de mon équipe : Luce Dauphinot, Serge Marty, Gaëlle Fontaine, Alexandra Botté, Alexandre Androuin, Lydie Boussicault, Yah-sé Abbada, Ihsen Youssef et Tengfé Li. Merci à tous pour votre présence et vos conseils qui m'ont permis d'évoluer. Je garde en mémoire les petits après-midi barbecue chez Marie-Claude, notre participation à La Parisienne! Tengfé, Yah-sé et Ihsen merci pour ces moments de rire ! Vos petites taquineries ont mis de l'ambiance et m'ont bien fait rire ! Soyez sages !!

Lydie, merci pour ton aide, pour tes nombreux conseils et pour m'avoir accompagnée dans la réflexion scientifique de ce projet cette durant ma dernière année de thèse.

Merci au Professeur Charles Duyckaerts et au Docteur Benoît Delatour pour leurs conseils et leurs remarques bienveillantes.

Je remercie particulièrement le Docteur Catherine Marquer qui m'a encadré durant mon M2. Merci beaucoup Catherine pour ce que tu m'as appris, pour ton investissement, et pour nos nombreuses discussions que nous avons eues. Tu as toujours été disponible, volontaire et ce, malgré la distance ! Je te souhaite le meilleur pour la suite et de trouver un poste aux Etats-Unis ou ailleurs ! Un grand merci à Kunie Roussel-Ando pour tes nombreux conseils techniques et ta gentillesse. Merci à Adina Lazar pour ta bonne humeur, je te souhaite beaucoup de bonheur avec la future naissance de ton bout de chou !! Pupici !

Je souhaite également remercier les membres de l'équipe « Prions ». Merci plus particulièrement à Alexianne pour ta gentillesse, tous ces bons moments et ces fous rires ! Je n'oublie pas tous ces petits kinders et gâteaux déposés à mon bureau... Bon courage pour la fin de thèse ! Je te souhaite pleins de bonnes choses et j'espère te revoir par la suite ! Merci à Nicolas et Etienne pour nos échanges et discussions. Je n'oublie pas Valeria, Sofian et Sébastien. Valeria, « copine du week-end », merci pour ces nombreux moments passés ensemble au laboratoire les weekends, ta bonne humeur, les petites livraisons express du midi et sans oublier ces bonbons déposés sur mon bureau ! Je te souhaite de t'épanouir dans tes futurs projets professionnels. Merci à Sofian et Sébastien pour votre gentillesse ! Je retiendrai une seule phrase : « j'en sais rien je ne suis pas dans le tube ! »

Je remercie plus largement toutes personnes de l'institut avec lesquelles j'ai partagé de bons moments et plus particulièrement Aude, Laura et Cynthia. Aude, un grand merci pour sa gaieté au jour le jour et ta spontanéité. Merci Laura pour toutes ces petites discussions. Alors à quand ta prochaine série du moment ? Cynthia, merci pour ta gentillesse et tes petits messages sur mon bureau. Merci encore à vous les filles pour tous ces moments de partage et de rigolade ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite et j'espère que l'on restera en contact !

Je souhaite également remercier David, Florence, Jérémie, Leo et enfin Sabah pour votre bonne humeur, et tous ces midis passés ensemble ! Merci à vous David et Florence pour vos conseils et vos petites recettes de cuisine ! Je te remercie Leo pour ton écoute, ton goût de la vie et du partage. C'était un plaisir de te rencontrer, ne change pas reste comme tu es. Un jour

on passera te voir en Argentine ! Enfin Sabah, MA Sabitaaah, je ne te remercierai jamais assez pour tous ces moments que l'on a passés ensemble. J'ai découvert une personne avec un grand cœur, toujours prête à écouter et aider. Je te remercie pour ton soutien infailible, ton énergie, ton enthousiasme, et pour me faire oublier les manip qui ratent. C'est une amitié qui a débuté il y a maintenant deux ans et qui j'espère de tout cœur, durera encore très longtemps. Je reprends une citation qui me tient à cœur : « L'amitié est la similitude des âmes. » Alcuin

Bien sûr, je n'oublie pas mes amis de longue date. Rabab, on se connaît depuis bien des années maintenant. Merci pour ces moments de partage et ces petites sorties pour se changer les idées. Toutes ces années passées ensemble comptent pour moi. Les hauts, les bas ont fortifiés notre amitié et j'espère qu'elle perdurera encore très longtemps ! Hadlenn je te remercie pour tout le soutien que tu m'as apporté, ta serviabilité et ton honnêteté. On se connaît depuis plus de dix ans et cela compte énormément pour moi. Merci à mes bras cassés Kadidia et Assana. Vous avez été ma bouffée d'air frais ! C'est une aventure qui a débuté à Newlook et que je ne regrette absolument pas ! Merci pour toutes ces soirées passées ensemble, pour ces fous rires interminables, et pour m'avoir soutenue ! Je vous aime ! Newlook m'a permis de rencontrer une autre amie, Dorra, qui a toujours su m'écouter. On se voit très peu mais c'est toujours un plaisir de te voir toi et ta petite famille. Un grand merci à Khadidja, Anne, Lise et Mokhtar mes amis de fac, toujours opérationnels pour un ciné ! Merci pour votre soutien, pour ces débats et ces discussions que nous avons eu ! Khadidja, je garde un magnifique souvenir de la Turquie. Je te revois encore t'arrêter à chaque boutique ! Un grand merci pour ton écoute, ta serviabilité et tes conseils. Une petite pensée pour Barkoff (alias Picsou)... Merci à vous tous pour ce que vous m'apportez, je suis heureuse de vous avoir dans ma vie ! « Les amis sont la famille que nous choisissons ».

Enfin, je remercie énormément ma famille, en particulier mes parents, pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces trois ans. Merci pour tout cet amour, cette patience et vos encouragements. Si j'en suis arrivée là, c'est grâce à vous. Je vous remercie pour l'éducation que vous m'avez apportée et pour bien plus encore. Je vous aime énormément ! Merci à mes sœurs, toutes différentes les unes des autres, vous m'avez apporté votre soutien chacune à votre manière. Je ne vous le dis que très rarement mais je souhaite vous dire combien vous êtes importantes pour moi.

RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par une perte mnésique progressive. Deux types de lésions apparaissent au cours de cette maladie : les plaques amyloïdes extracellulaires, résultant de l'agrégation de peptides amyloïdes (A β), et les dégénérescences neurofibrillaires constituées d'agrégats intraneuronaux de protéines Tau hyper-phosphorylées.

Le cholestérol joue un rôle central dans la physiopathologie de la MA. En particulier, l'allèle ϵ 4 du gène de l'apolipoprotéine E, transporteur cérébral du cholestérol, est le principal facteur de risque génétique des formes sporadiques de la MA. La quantité de cholestérol est plus élevée dans les cerveaux de patients atteints de la MA, et mon équipe a montré que le cholestérol s'accumule dans les plaques séniles. De plus, l'existence d'un site de liaison entre le cholestérol et l'Amyloid Precursor Protein (APP) a été démontrée par résonance magnétique nucléaire.

L'objectif de mon travail était d'étudier les effets de mutations au sein du site de liaison du cholestérol (SLC) de l'APP (situé sur la séquence 20-39 de l'A β ou 691-710 de l'APP770), sur la production de peptides amyloïdes, le clivage de l'APP par les sécrétases et sur la localisation subcellulaire des mutants de l'APP dans les cellules HEK293T. Parallèlement, j'ai étudié les effets des génotypes ApoE sur la sécrétion de peptides amyloïdes à partir de cultures primaires de neurones exprimant l'ApoE3 et l'ApoE4 humains.

Nous avons tout d'abord montré par résonance de plasmon de surface (RPS) que des mutations effectuées dans le SLC de l'APP abolissent totalement l'interaction entre les peptides et des liposomes chargés en cholestérol. Tous les mutants du SLC produisent beaucoup moins d'A β 40 et A β 42 lorsqu'ils sont exprimés dans les cellules HEK293T sans modifier les autres produits de clivage de l'APP. Nous avons mis en évidence deux catégories de mutations : les mutations juxtamembranaires qui augmentent la sécrétion de fragments courts d'A β et les mutations transmembranaires, incluant la mutation familiale italienne, qui diminuent la sécrétion de peptides courts d'A β . Ces résultats suggèrent un décalage du clivage des mutants par la γ -sécrétase et/ou une modification de sa processivité conduisant à la formation de peptides de courtes tailles. Le SLC est donc un acteur clef de la sécrétion de peptides amyloïdes. Parallèlement, nous avons montré que des cultures primaires de neurones exprimant l'ApoE4 sécrètent en plus grande quantité les peptides amyloïdes A β 38, 40 et 42 comparé à des neurones exprimant l'ApoE3. Les neurones ApoE4 expriment plus fortement les protéines tau et phospho-tau, mais plus faiblement l'ApoE « full length » par rapport aux neurones ApoE3. Le SLC et le génotype ApoE4 contribuent donc à l'augmentation de la sécrétion de peptides amyloïdes. Il serait intéressant de connaître les mécanismes cellulaires impliquant le SLC de l'APP, le cholestérol et son transporteur l'ApoE.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive loss of memory. Two types of lesions appear during the disease: the extracellular amyloid plaques, resulting from the aggregation of amyloid peptides (A β), and intraneuronal neurofibrillary tangles composed of aggregates of hyper-phosphorylated tau proteins.

Cholesterol plays a central role in the physiopathology of AD. In particular, the ϵ 4 allele of the gene for apolipoprotein E, essential brain transporter of cholesterol, is the major genetic risk factor for sporadic forms of AD. The amount of cholesterol is higher in the brains of patients with AD, and the team has shown that cholesterol accumulates in senile plaques. In addition, the existence of a binding site between cholesterol and APP was demonstrated by nuclear magnetic resonance.

The objective of my work was to study the effects of mutations within the APP cholesterol binding site (SLC) (located on A β 20-39 sequence or 691-710 sequence of APP770), on the production of amyloid peptides, the cleavage of APP by secretases and on the subcellular localization of APP mutants in HEK293T cells. Meanwhile, I studied the effects of ApoE genotypes on the secretion of amyloid peptides from primary cultures of neurons expressing human ApoE3 and ApoE4.

First, we showed by surface plasmon resonance (SPR) that mutations in the CBS of APP completely abolish the interaction between peptides and liposomes loaded with cholesterol. All CBS mutants produce much less A β 40 and A β 42 when expressed in HEK293T cells without altering the other APP cleavage products. We identified two mutations: juxtamembrane mutations that increase the secretion of short fragments of A β and transmembrane mutations, including the Italian family mutation, which decrease the secretion of short A β peptides. These results suggest a shift in the cleavage of mutants by γ -secretase and / or a modification of its processivity leading to the formation of short peptides. Thus, the CBS is a key actor in the secretion of amyloid peptides. At the same time, we have shown that primary cultures of ApoE4-expressing neurons secrete amyloid peptides A β 38, 40 and 42 in greater quantities compared to neurons expressing ApoE3. ApoE4 neurons express more strongly the tau and phospho-tau proteins, but more weakly the ApoE "full length" protein compared to the ApoE3 neurons. The CBS and the ApoE4 genotype therefore contribute to the increase of the amyloid peptides secretion. It would be interesting to know the cellular mechanisms involving the CBS of APP, cholesterol and its carrier ApoE.

Table des matières

Liste des abréviations.....	17
Liste des Figures	21
Liste des Tableaux	24
1 Introduction	28
1.1 La maladie d'Alzheimer.....	28
1.1.1 Historique et définition	28
1.1.2 Epidémiologie	29
1.2 Neuropathologie de la MA.....	33
1.2.1 Aspects macroscopiques	33
1.2.2 Aspects microscopiques	34
1.3 Physiopathologie de la MA	40
1.3.1 Le peptide amyloïde	41
1.3.2 La protéine tau	44
1.3.3 L'hypothèse de la cascade amyloïde	45
1.4 Les formes familiales et sporadiques de la MA.....	46
1.4.1 Les formes familiales	46
1.4.2 Les formes sporadiques.....	52
1.5 L'ApoE4 : un facteur de risque majeur de la MA	55
1.5.1 Structure de l'ApoE.....	56
1.5.2 L'ApoE et les lipides	58
1.5.3 L'ApoE et la clairance de l'Aβ.....	58
1.5.4 L'ApoE, l'agrégation de l'Aβ et la neurotoxicité	60
1.6 Le métabolisme du cholestérol et la MA	62
1.6.1 Le métabolisme du cholestérol cérébral	62
1.7 Le cholestérol et la maladie d'Alzheimer	71
1.7.1 Le cholestérol chez les patients atteints de la MA	71
1.7.2 Effets du cholestérol <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	74
1.7.3 Dans les radeaux lipidiques	76
1.7.4 Les traitements ciblant la synthèse de cholestérol : les statines.....	77
1.8 L'APP et ses domaines d'interactions	79
1.8.1 Interaction lipide-protéine	79

1.8.2	Interactions protéine-protéine	87
1.9	Objectifs de la thèse	92
2	Matériels et méthodes	98
2.1	Matériel	98
2.1.1	Plasmide et Réactifs.....	98
2.1.2	Les souris ApoE	101
2.2	Méthodes.....	102
2.2.1	Cultures cellulaires	102
2.2.2	Dosage des produits de clivage de l'APP	104
2.2.3	Extraction protéique et western blot	108
2.2.4	Immunocytochimie et microscopie confocale.....	109
2.2.5	Etude de l'interaction des peptides et des liposomes chargés en cholestérol par résonance de plasmon de surface (RPS)	110
2.2.6	Analyse statistique.....	111
3	Résultats.....	116
3.1	Validation du site de liaison du cholestérol sur l'APP par résonance de plasmon de surface 116	
3.2	Production de mutants APP dans le site de liaison du cholestérol (SLC)	120
3.2.1	Effets des mutations dans le SLC sur le clivage de l'APP	122
3.2.2	Production intracellulaire de peptides amyloïdes	126
3.2.3	Sécrétion de peptides amyloïdes A β >28	127
3.2.4	Analyse de la localisation subcellulaire des mutants du SLC de l'APP	129
3.3	Clivage des mutants par l'alpha, la bêta-sécrétase et la gamma-sécrétase	133
3.4	Effets d'une modulation de cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC.....	139
3.4.1	Mesure de la sécrétion de peptides amyloïdes après déplétion du cholestérol membranaire.....	139
3.4.2	Mesure de la sécrétion de peptides amyloïdes après augmentation du cholestérol membranaire.....	141
3.4.3	Analyse de la localisation de l'APPwt et l'APP-K28A dans les radeaux lipidiques	141
3.5	Effets du génotype ApoE sur la sécrétion d'A β et l'expression de protéines intracellulaires 144	
3.5.1	Sécrétion de peptides A β 38, 40 et 42.....	144
3.5.2	Analyse de l'expression des protéines intracellulaires : tau, phospho-tau, ApoE et APP 146	
4	Discussion.....	152

4.1	Le SLC de l'APP : un domaine de liaison au cholestérol atypique	153
4.2	Les mutants du SLC modulent la sécrétion de peptides amyloïdes sans affecter le clivage ϵ de l'APP par la γ -sécrétase	156
4.2.1	La mutation familiale	156
4.2.2	Les mutants juxtamembranaires	158
4.2.3	Les mutants transmembranaires	164
4.3	La modulation du cholestérol membranaire influence la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC	169
4.4	Comment la liaison du cholestérol sur l'APP favorise la sécrétion de peptides amyloïdes et conduit à la MA ?	172
4.5	Effets du génotype ApoE sur la sécrétion d'A β et l'expression de protéines intracellulaires 174	
5	Conclusion et perspectives.....	178
6	Bibliographie	184
7	Annexes	236

Liste des abréviations

- AAC** : Angiopathie amyloïde cérébrale
- AAV** : Adeno-Associated Virus
- A β** : Peptide amyloïde β
- ABC** : ATP Binding Cassette
- ABCA7** : Membre 7 de la sous famille A des transporteurs ABC
- ACAT** : Acétyl-CoA AcétylTransferase
- ADAM** : A Desintegrin And Metalloproteinase
- AICD** : Amyloid Intracellular Domain »
- APH-1** : Anterior Pharynx Defective 1
- APOD** : Apolipoprotéine D
- APOE** : Apolipoprotéine E
- APOJ** : Apolipoprotéine J
- APP** : Amyloid β Precursor Protein
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- AVC** : Accident Vasculaire Cérébral
- BACE1** : β site APP Cleaving Enzyme 1
- β -CTF** : β C Terminal Fragment
- BHE** : Barrière Hémato-Encéphalique
- BIN1** : Intégrateur de pontage 1 aussi appelé amphiphysine II
- CD2AP** : Protéine associée à CD2
- CD33** : Cluster de différenciation 33
- CLU** : Clusterine
- CRAC** : Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus

DAPT : N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester

DHA : Acide docosahexaénoïque

DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire

FDG-TEP : TEP avec le FluoroDeoxyGlucose pour radio traceur

GWAS : Genome-Wide Association Study

HCHAA : Hémorragies Cérébrales Héritaires Avec Amylose

HMGCR : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (ou 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase)

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

INSED : Institut National des études démographiques

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDL : Low-Density Lipoprotein

LDLR : Récepteur de lipoprotéines de faible densité (LDL)

LRP1 : Récepteur 1 apparenté au LDLR

LTP : Long-term potentiation

LXR : Liver X Receptor

MA : Maladie d'Alzheimer

MBCD : Méthyl-β-cyclodextrine

MBCD-C : Méthyl-β-cyclodextrine-cholestérol

MCI : Mild Cognitive Impairment

PEG : Polyéthylène-glycol

PHFs : Paired Helical Filaments

PIB : Produit Intérieur Brut

PiB : Pittsburgh compound B

PICALM : Protéine d'assemblage des clathrines liées au phosphatidylinositol

PI3K : Phosphatidylinositol kinase de type 3

PSEN1 : Préséniline 1

PSEN2 : Préséniline 2

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SCAP : SREBP Cleavage-Activating Protein

Siglec : Sialic acid-binding ImmunoGlobulin-type LECTins

SLC : Site de Liaison du Cholestérol

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SORL1 : Récepteur associé à la sortiline

SPR : Surface Plasmon Resonance

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein

TEP : Tomographie à Emission de Positrons

Tau : Tubulin Associated Unit

WT : Souris sauvage, de l'anglais « Wild-Type »

Liste des Figures

Figure 1 : Alois Alzheimer et les dégénérescences neurofibrillaires.	28
Figure 2 : La MA aux Etats-Unis.	29
Figure 3 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) à haute résolution (Teipel et al. 2015).	33
Figure 4 : Morphologie des DNF.	34
Figure 5 : Représentation schématique de la progression spatio-temporelle des DNF.	35
Figure 6 : Morphologie des dépôts amyloïdes.	36
Figure 7 : Progression spatio-temporelle du dépôt des plaques amyloïdes.	37
Figure 8 : Images TEP au florbetapir F18.	39
Figure 9 : Images FDG-TEP de patients.	40
Figure 10 : Les voies de clivage de l'APP : non-amyloïdogénique et amyloïdogénique.	41
Figure 11 : Séquence d'évènements pathogéniques majeurs conduisant à la MA suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde (Selkoe and Hardy 2016).	46
Figure 12 : Les mutations Familiales sur l'APP (acides aminés 647 à 730).	47
Figure 13 : Les mutations familiales de l'APP.	48
Figure 14 : Vue d'ensemble schématique des gènes associés à la MA.	55
Figure 15 : Représentation schématique de la structure de l'ApoE.	57
Figure 16 : Les effets multifactoriels de la pathologie de la MA médiés par l'ApoE.	62
Figure 17 : Métabolisme du cholestérol intracérébral.	64
Figure 18 : Voie de synthèse du cholestérol (Cyster et al. 2014).	65
Figure 19 : Le contrôle de la biosynthèse lipidique par la voie SREBP.	66
Figure 20 : Représentation schématique du rôle des radeaux lipidiques dans le clivage de l'APP.	70
Figure 21 : Représentation schématique de C99.	80
Figure 22 : Représentation schématique de C99 transmembranaire au niveau du site de liaison du cholestérol de l'APP.	83
Figure 23 : Structure des protéines membres de la famille APP dans différentes espèces.	87
Figure 24 : Hypothèse de l'étude du SLC (APP muté).	93
Figure 25 : Carte plasmidique du plasmide pmChery-N1 (Clontech).	98
Figure 26 : Représentation schématique de la détection et de la capture des anticorps anti-A β des kits IBL et MSD.	105

Figure 27 : Représentation schématique des sites de reconnaissances des anticorps 6E10 et 4G8. .	106
Figure 28 : La résonance de plasmon de surface (RPS).	111
Figure 29 : La résonance de plasmon de surface (RPS).	116
Figure 30 : Séquence des peptides dérivés de la séquence de l'APP.	117
Figure 31 : Mesure de la variation du signal de réflectivité correspondant à l'interaction entre les peptides et les liposomes chargés à 40% de cholestérol.	118
Figure 32 : Séquences des peptides wt APP9 et muté APP10 biotinylés.	119
Figure 33 : Les mutations dans le SLC.	121
Figure 34 : Représentation schématique de l'étude du SLC en trois étapes.....	122
Figure 35 : Représentation schématique des sites de reconnaissances des anticorps 4G8 (en vert) et 6E10 (en bleu) (partie du bas).	123
Figure 36 : Modulation de la sécrétion d'Aβ40 et 42 par les mutants du SLC de l'APP dans les HEK293T transfectées.	124
Figure 37 : Modulation de la production intracellulaire d'Aβ40 par les mutants du SLC de l'APP dans les HEK93T transfectées.	126
Figure 38 : Modulation de la sécrétion d'Aβ (1-x) par les mutants du SLC de l'APP dans les HEK93T transfectées.....	128
Figure 39 : Classification des mutants du SLC en trois catégories selon la sécrétion de peptides amyloïdes.	129
Figure 40 : Colocalisation du signal mCherry dans les endosomes précoces.....	130
Figure 41 : Colocalisation des mutants du SLC dans les endosomes précoces.	131
Figure 42 : Colocalisation des mutants du SLC dans les endosomes précoces.	132
Figure 43 : Voies de clivages amyloïdogénique et non amyloïdogénique de l'APP.	134
Figure 44 : Clivage des mutants du SLC par l'α et la β-sécrétase dans les HEK293T transfectées.	135
Figure 45 : Activité de l'α, β et γ-sécrétase sur les mutants du SLC dans les HEK293T transfectées. .	136
Figure 46 : Activité de l'α, β et γ-sécrétase sur les mutants du SLC dans les HEK293T transfectées. .	137
Figure 47 : Clivage des mutants du SLC par l'α et la β-sécrétase dans les HEK93T après traitement au DAPT.....	138
Figure 48 : Modulation de la sécrétion de peptides amyloïdes par l'APPwt et le mutant K28A après extraction du cholestérol membranaire par la MBCD.	140
Figure 49 : Analyse de la localisation du mutant K28A dans les radeaux lipidiques.	142
Figure 50 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).....	143
Figure 51 : Mesure de la production de peptides Aβ38, 40 et 42 extracellulaire de neurones corticaux ApoE3 et ApoE4.....	145

Figure 52 : Quantification de l'expression des protéines intracellulaires Tau, phospho-tau, ApoE et APP dans des cultures de neurones ApoE3 et ApoE4 à DIV12.	147
Figure 53 : Classification des mutants du SLC en trois catégories selon la sécrétion de peptides amyloïdes.	152
Figure 54 : Comparaison des séquences de l'A β contenant le SLC en rouge selon les espèces.	155
Figure 55 : Modélisations moléculaires de l'interaction entre le peptide A β (en rouge) et le cholestérol (en jaune).	156
Figure 56 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).	158
Figure 57 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).	160
Figure 58 : Modèle proposé de la processivité de la γ -sécrétase basé sur la suppression de charge ou l'inversion de charge de la lysine 28.	162
Figure 59 : Modèle de clivages successifs des mutants par la γ -sécrétase.	163
Figure 60 : Voies de clivages amyloïdogénique et non amyloïdogénique de l'APP.	166
Figure 61 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).	167
Figure 62 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).	169
Figure 63 : Les effets de la modulation du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes dans les cellules transfectées avec l'APPwt.	170
Figure 64 : Les effets de la modulation du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par l'APP muté K28A.	171
Figure 65 : Représentation schématique des effets des produits de clivages de l'APP sur le métabolisme du cholestérol (d'après Beel et al 2008).	173

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Evolution de la population totale par groupe d'âge d'après l'Insee (www.insee.fr).	30
Tableau 2 : Phénotype des mutations familiales de l'APP.	52
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour introduire des mutations dans le plasmide APP751- mCherry.....	100
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude.....	101
Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires utilisés dans cette étude.....	101
Tableau 6 : Comparaison de la sensibilité et de la détection des kits de dosage MSD et IBL.....	104

Introduction

1 Introduction

1.1 La maladie d'Alzheimer

1.1.1 Historique et définition

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par l'atteinte des structures temporales internes engendrant un déficit de la mémoire épisodique (Hodges 2006). La maladie évolue avec un processus neurodégénératif qui s'étend vers d'autres aires corticales, entraînant une atteinte du langage et des fonctions instrumentales allant jusqu'à la perte d'autonomie (Ballard et al. 2011).

Lors d'une conférence en 1906, le psychiatre allemand Alois Alzheimer (1864-1915) décrit pour la première fois la MA. Il expliqua le cas d'une patiente de 51 ans, Auguste Deter, qui fut admise à l'hôpital de Francfort et qui présentait des troubles de la mémoire et du comportement. Après la mort de la patiente, il autopsia son cerveau et décrivit les caractéristiques neuropathologiques de la maladie dans un article en 1907 (Alzheimer et al. 1995) (Figure 1). Alois Alzheimer ne fut pas le seul à avoir découvert cette pathologie. En effet, en 1898 Emil Redlich avait décrit plusieurs autres cas présentant des plaques séniles. En 1907, Oskar Fisher détailla les deux lésions de la MA dans un rapport. C'est en 1910, que « la maladie d'Alzheimer » est mentionnée pour la première fois par Emil Krapelin, directeur de la clinique psychiatrique royale de Munich.

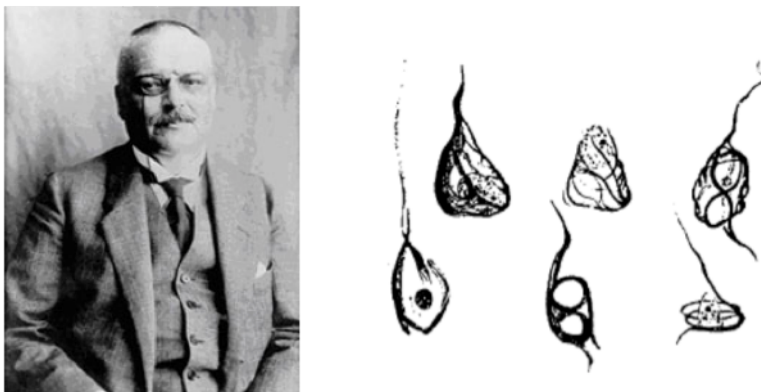


Figure 1 : Alois Alzheimer et les dégénérescences neurofibrillaires.
À gauche : photographie d'Alois Alzheimer (1864-1915). À droite : Dessins faits par Alois Alzheimer représentant les dégénérescences neurofibrillaires observées à partir des coupes histologiques du cerveau de sa patiente Auguste Deter.

1.1.2 Epidémiologie

Une personne sur neuf âgée de plus de 65 ans est touchée par la maladie aux Etats-Unis. 61% des personnes ayant la maladie (parmi les personnes âgées de 70 ans) devraient décéder avant l'âge de 80 ans. Le nombre estimé de personnes atteintes de la MA aux Etats-Unis est estimé à 5,4 millions (Association Alzheimer) et est supposé tripler entre 2010 et 2050 (Figure 2) (Hebert et al. 2013).

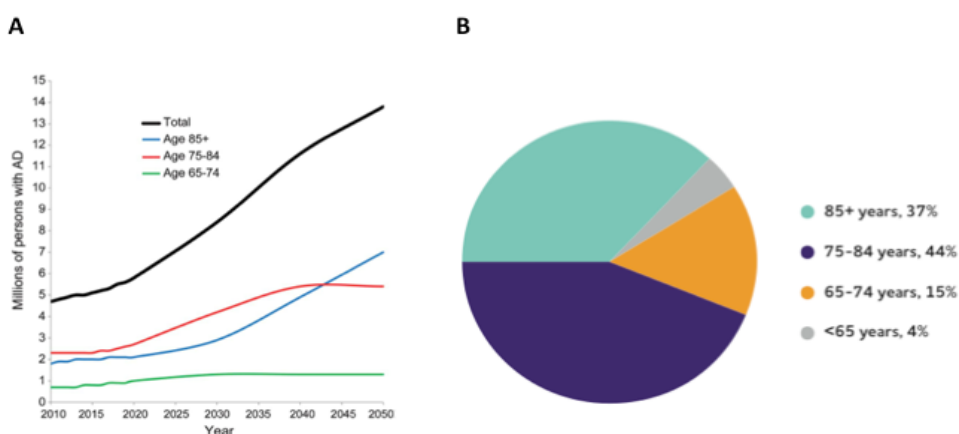


Figure 2 : La MA aux Etats-Unis.

A : Evolution du nombre estimé de personnes atteintes par la MA entre 2010 et 2050 aux Etats-Unis. **B** : Camembert représentant la répartition des malades par classes d'âge de personnes touchées par la maladie aux Etats-Unis ((Hebert et al. 2013), Association Alzheimer).

L'espérance de vie de la population ne cesse d'augmenter. L'institut National des études démographiques (Insed) estime qu'entre 1740 et 2014 la durée de vie moyenne est passée de 25 ans à 80 ans environ. En 2015, l'espérance de vie à la naissance en France métropolitaine est évaluée par l'Insed à environ 79 ans pour les hommes et 85,1 ans pour les femmes. Le bilan démographique établi par l'institut national de la statistique et des études économiques (Insee) estime au 1^{er} Janvier 2016 une population de 66,6 millions d'habitants en France, avec 18,8% de la population qui a 65 ans ou plus. En vingt ans ce pourcentage des personnes ayant 65 ans ou plus, passe de 15,1% à 18,8% (Tableau 1). Le vieillissement de la population constitue un problème majeur avec des conséquences politiques, économiques et sociales importantes.

Année	Population au 1 ^{er} janvier (en milliers)					Proportion (en %)			
	Moins de 20 ans	de 20 à 59 ans	de 60 à 64 ans	65 ans ou plus	dont 75 ans ou plus	Moins de 20 ans	de 20 à 64 ans	65 ans ou plus	dont 75 ans ou plus
1996	15 626	31 974	2 907	8 980	3 752	26,3	58,6	15,1	6,3
2006	15 888	34 136	2 828	10 334	5 159	25,1	58,5	16,4	8,2
2010	16 011	33 997	3 874	10 732	5 660	24,8	58,6	16,6	8,8
2011	16 038	33 920	4 106	10 869	5 757	24,7	58,6	16,7	8,9
2012	16 047	33 891	4 121	11 182	5 844	24,6	58,3	17,1	9,0
2013	16 096	33 831	4 120	11 518	5 915	24,5	57,9	17,6	9,0
2014 (p) hors Mayotte	16 166	33 745	4 086	11 857	5 984	24,5	57,5	18,0	9,1
2014 (p) y c. Mayotte	16 286	33 836	4 089	11 863	5 986	24,6	57,4	18,0	9,1
2015 (p) y c. Mayotte	16 359	33 741	4 074	12 206	6 063	24,6	57,0	18,4	9,1
2016 (p) y c. Mayotte	16 396	33 668	4 044	12 520	6 081	24,6	56,6	18,8	9,1

(p) résultats provisoires à fin 2015.

Champ : France hors Mayotte jusqu'en 2014 et y compris Mayotte à partir de 2014.

Source : Insee, estimations de population.

Tableau 1 : Evolution de la population totale par groupe d'âge d'après l'Insee (www.insee.fr).

En France, d'après l'institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), 900 000 personnes souffrent de la MA actuellement et ce chiffre atteindra 1,3 million en 2020. Ce sont des chiffres alarmants et sous-estimés car seulement un cas de démence sur deux est identifié aussi bien en France (Helmer et al. 2008) que dans d'autres pays (Tyas et al. 2006; Lithgow, Jackson, and Browne 2012). D'après le rapport de 2012 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur la démence, la France comptait en 2010 1,1 million de personnes atteintes de démence et faisait partie des neuf pays possédant le plus grand nombre de personnes atteintes à travers le monde.

Les femmes sont plus touchées par la MA et par d'autres démences. Parmi les femmes de 71 ans et plus, environ 16% seraient atteintes de la MA (ou autres démences) contre 11% chez les hommes (Seshadri et al. 1997; Plassman et al. 2007; Prince et al. 2013). D'après l'INSERM, sur 25 malades 10 sont des hommes et 15 des femmes. Ceci peut être expliqué par le fait que les femmes vivent plus longtemps que les hommes (Hebert et al. 2001; Plassman et al. 2007). Une autre explication à la prévalence pour la MA plus importante observée chez la population féminine à 65 ans est qu'à cet âge beaucoup d'hommes développent des maladies cardiovasculaires entraînant un fort taux de mortalité masculine (Chêne et al. 2015). Dans cette étude, les auteurs expliquent que le haut risque de maladies cardiovasculaires est lié à un haut risque pour la MA. La mort des hommes liée aux maladies cardiovasculaires fausse donc les chiffres de prévalence pour la MA (Ott et al. 1996). Des études stipulent que le déclin cognitif et le développement de la maladie pourraient être associés à la concentration

d'œstrogènes. Ce qui suggère un rôle neuro-protecteur des œstrogènes (Dubal and Wise 2002; Fillit 2002).

1.1.2.1 Les coûts de la maladie

Le rapport annuel 2015 du « Global Observatory for Ageing and Dementia Care » (Alzheimer's Disease International, London, UK) estime que 46,8 millions de personnes souffrent de démence dans le monde, et ce nombre est estimé à 131,5 millions en 2050. Le vieillissement de la population et l'augmentation du nombre de personnes atteintes par la maladie prennent une ampleur importante. De plus, ces chiffres ont des répercussions sur les coûts liés à la maladie. Les coûts liés à la maladie sont répertoriés en trois catégories : les coûts médicaux directs, les coûts de soins sociaux directs (qui correspondent aux dépenses liées aux employeurs et soins professionnels à domicile ou encore aux résidences et institutions pour personnes âgées) et les coûts des soins informels (non payés). Ces coûts mondiaux globaux passent de \$604 milliards en 2010 à \$818 en 2015, ce qui représente 1,09% du PIB mondial. Cette augmentation est valable pour toutes les régions du monde, en particulier pour les régions d'Afrique et d'Asie de l'est pour lesquelles la prévalence est plus élevée. Les coûts médicaux directs représentent 20% des coûts globaux totaux et les coûts des soins sociaux directs et des soins informels représentent chacun 40%. La contribution des soins informels est plus importante dans les régions africaines et plus faible en Amérique du nord, Europe de l'ouest et certaines régions de l'Amérique du Sud contrairement aux soins sociaux qui suivent un profil inverse.

1.1.2.2 Importance du diagnostic précoce

La MA constitue aujourd'hui un défi socio-économique de grande ampleur, de par son coût, et un nombre de malades croissant. Il est donc primordial d'établir un diagnostic précoce de la maladie. Prince et al., mettent en évidence que le coût social engendré par cette maladie pourrait être réduit par une prise en charge des malades adaptée et établie précocement. Le diagnostic des malades est une étape primordiale, car très souvent la maladie est confondue avec un vieillissement naturel des patients (Prince et al. 2013). En effet, il est difficile de distinguer un déclin des capacités cognitives lié à un vieillissement dit « normal », d'un déclin

cognitif léger MCI (de l'anglais « Mild Cognitive Impairment »), qui précède souvent la MA (Morris et al. 2001; Salloway and Correia 2009).

1.1.2.3 Facteurs de risque environnementaux

Le principal facteur de risque de la MA est l'âge, cependant de nombreux autres facteurs ont été décrits comme étant liés à la MA tels que le diabète, le sexe, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, ou encore l'obésité.

Des études épidémiologiques mettent en évidence une corrélation entre la maladie d'Alzheimer et le diabète (Breteler 2000). Plusieurs études montrent que les patients diabétiques ont un risque de développer la MA qui augmente par rapport à des contrôles (Brands et al. 2005; Cukierman, Gerstein, and Williamson 2005; Biessels, Kappelle, and Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group 2005). Par ailleurs, 80% des patients atteints de la MA présentent une déficience dans la tolérance au glucose ou un diabète (Janson et al. 2004). La prévalence pour la MA augmenterait d'un facteur de 2 chez les patients atteints du diabète de type 2 (Leibson et al. 1997; Luchsinger et al. 2001).

La neurodégénérescence et les troubles cognitifs dans le diabète de type 2 et la MA pourraient être causés, en partie, par des déficiences de signalisation liées aux récepteurs de l'insuline (de la Monte and Wands 2005). Des études ont démontré que l'administration d'insuline ou de somatostatine améliore considérablement les performances de mémorisation chez les patients atteints de la MA (Craft et al. 1999; Craft et al. 2003).

D'autres études ont montré que l'hypercholestérolémie serait un facteur de risque lié à la maladie d'Alzheimer (M. Kivipelto et al. 2001) et contribue à l'amyloïdogénèse (Ujiie et al. 2003; Zipser et al. 2007). Nous développerons ce sujet un peu plus tard dans le chapitre 1.7.

Enfin, l'hypertension en milieu de vie est : associée à une augmentation du risque de la MA et de démence chez les personnes âgées (Swan et al. 1998; Launer et al. 2000; Miia Kivipelto et al. 2001; Whitmer et al. 2005), engendre une augmentation de la charge des corps neurofibrillaires et des plaques séniles (Petrovitch et al. 2000) et agirait sur l'intégrité vasculaire de la barrière hémato-encéphalique (BHE) entraînant des altérations cellulaires, une réduction des fonctions neuronales et synaptiques, de l'apoptose et une augmentation de l'accumulation de peptides A β (Deane, Wu, and Zlokovic 2004).

1.2 Neuropathologie de la MA

Le Dr. Alois Alzheimer a décrit dans ses rapports deux principales lésions de la MA : les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes. Ce chapitre présentera les aspects macroscopiques et microscopiques de la maladie avec une description détaillée des lésions retrouvées dans la maladie.

1.2.1 Aspects macroscopiques

Les patients atteints de la MA présentent une atrophie cérébrale sévère, et plus précisément une atrophie corticale et de l'hippocampe (Figure 3). On observe par conséquent un élargissement des ventricules et des sillons, ainsi qu'un rétrécissement des circonvolutions. L'hippocampe des patients atteints de la MA présente une diminution du volume très sévère par rapport à un individu sain. En effet, plusieurs études ont montré une diminution drastique du volume de l'hippocampe par imagerie par résonance magnétique (IRM) chez les patients atteints de la MA (Jack et al. 2000; Du et al. 2004; Jack et al. 2004; M. Hashimoto et al. 2005; van de Pol et al. 2006; Jack et al. 2008). Cette diminution du volume cérébral a pour conséquence une diminution du poids, évaluée entre 200 et 500g, du cerveau des patients atteints de la MA (Esiri 2007).

L'IRM permet de visualiser l'atrophie cérébrale bien avant la mort du patient, lors d'un diagnostic clinique. De plus, plusieurs études IRM ont montré que l'allèle $\epsilon 4$ du gène codant pour l'apolipoprotéine E (le principal facteur de risque de la MA) est associé à la diminution du volume de l'hippocampe (Moffat et al. 2000; Van de Pol et al. 2007; Jack et al. 2008).

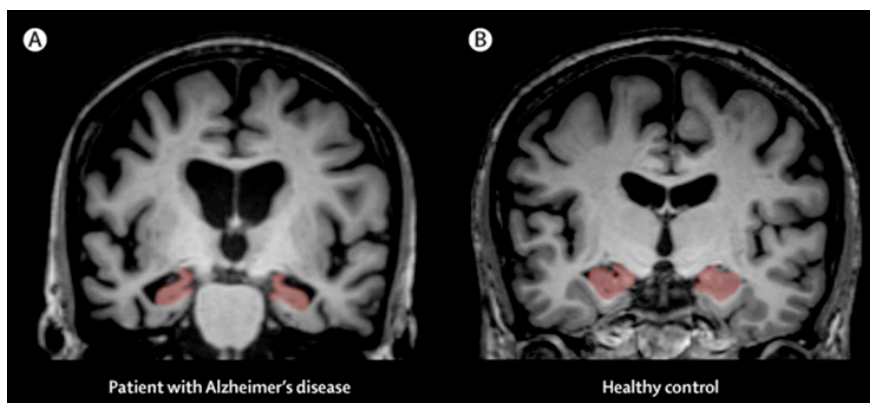


Figure 3 : Imagerie par résonance magnétique (IRM) à haute résolution (Teipel et al. 2015).

Les coupes coronales présentées à partir de scans IRM structurelles à haute résolution représentent la tête de l'hippocampe (marquée en rouge) chez un patient souffrant de la MA (A) et un contrôlé en bonne santé (B). Une sévère atrophie de l'hippocampe chez le patients atteint de la MA est évidente par comparaison visuelle avec le témoin sain.

1.2.2 Aspects microscopiques

1.2.2.1 Les dégénérescences neurofibrillaires

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) a été décrite par Alois Alzheimer en 1906 (Alzheimer et al. 1995) (Figure 4). Cette lésion cérébrale est caractérisée par un appariement anormal des microtubules neuronaux, causé par l'accumulation intracellulaire de la protéine associée aux microtubules : tau (de l'anglais « tubulin associated unit »). Cette protéine est le principal constituant des DNF (Brion et al. 1985). Elle a pour rôle de se lier et de stabiliser les microtubules (Drubin and Kirschner 1986) afin de réguler le transport axonal.

Quatre types de marquages permettent de visualiser les DNF : des immunomarquages avec des anticorps anti-tau, la coloration au rouge Congo ou à la Thioflavin-S (Arnold et al. 1991), et la méthode d'imprégnation argentique dite méthode de Gallias (Iqbal et al. 1991).

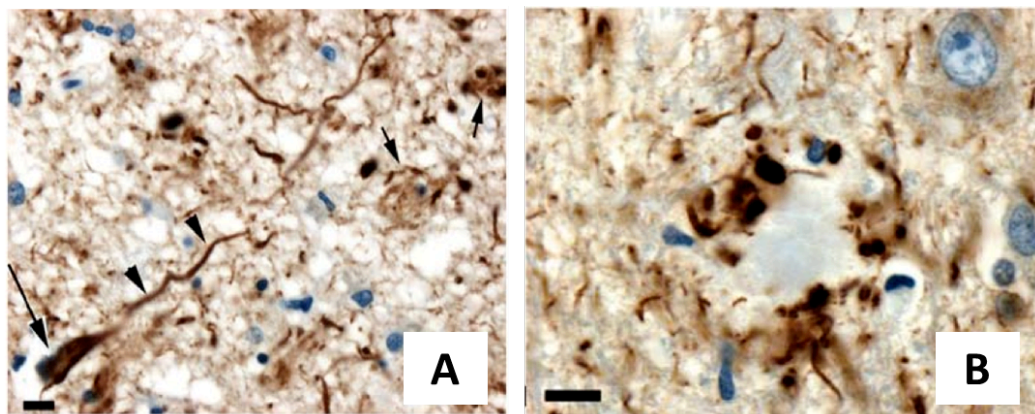


Figure 4 : Morphologie des DNF.

A : Immunomarquage anti-tau (anticorps AT8) mettant en évidence une DNF typique en forme de flamme (flèche entière). Tau est accumulée au niveau des dendrites (têtes de flèches).

B : Immunomarquage anti-tau (anticorps Dako) permet de distinguer une couronne d'une plaque sénile tau-positif avec son noyau amyloïde non-marqué. (Figure modifiée à partir de Duyckaerts, Delatour, and Potier 2009)

Les patients atteints de la MA présentent une hyper-phosphorylation et une phosphorylation anormale de la protéine tau (Grundke-Iqbal et al. 1986; Greenberg et al. 1992), ce qui a pour conséquence une perte d'affinité de tau pour les microtubules (Iqbal et al. 1986), conduisant à la déstructuration des microtubules. Les neurofibrilles constituées de la protéine tau entraînent donc une perte de fonction du transport axonal qui conduit par la suite à la dégénérescence neuronale. Ces paires de filaments de protéine Tau prennent une conformation particulière en forme d'hélice et ont reçu la dénomination anglo-saxonne de « paired helical filaments » (PHF), en français DNF (Kidd 1963; Kidd 1964).

L'évolution de la formation progressive des DNF dans le cerveau corrèle parfaitement avec la durée et la sévérité de la démence (contrairement aux plaques amyloïdes). Ainsi les six stades de Braak (Figure 5), décrivent un profil évolutif des DNF au cours du temps dans la maladie d'Alzheimer (H. Braak and Braak 1991).

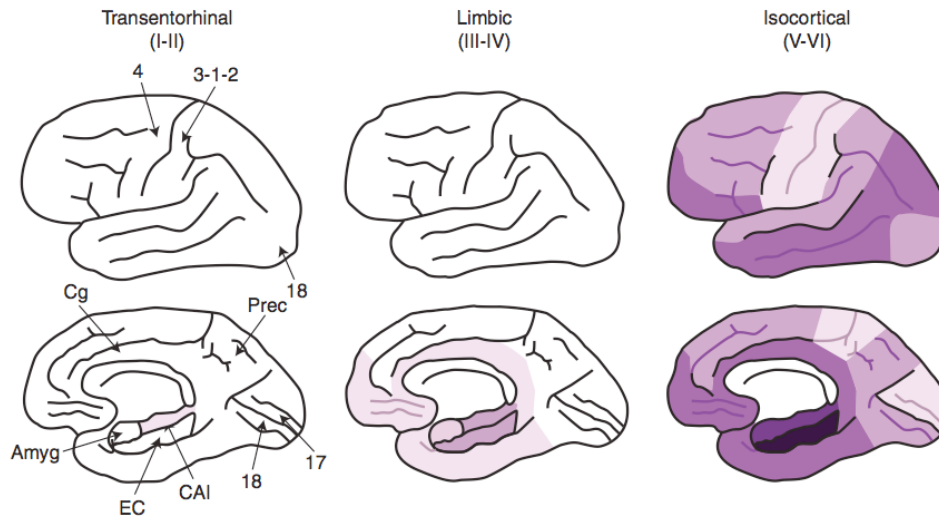


Figure 5: Représentation schématique de la progression spatio-temporelle des DNF.

La distribution de la DNF est représentée en violet et les intensités de couleurs correspondent aux densités des DNF. Amyg : Amygdale ; EC : Cortex entorhinal ; CA1 : aire CA1 de l'hippocampe ; Cg : Cortex cingulaire ; Prec : Précuneus ; 4 : Cortex primaire moteur ; 3-1-2 : Cortex primaire sensoriel ; 17 : Cortex primaire visuel ; 18 : Cortex associatif visuel. (Serrano-Pozo et al. 2011).

La formation des DNF dans la MA est assez prévisible et suit une séquence stéréotypée (Arnold et al. 1991; H. Braak and Braak 1991; Heiko Braak et al. 2006). Les six stades d'évolution sont classés en trois phases : entorhinal, limbique et néocortical. La phase entorhinale correspond aux stades I et II. Les DNF apparaissent dans la région transentorhinale au stade I, et dans la région CA1 de l'hippocampe (Corne d'Ammon) au stade II. Dans la phase suivante dite limbique, les DNF se propagent au stade III, au niveau du subiculum de l'hippocampe pour atteindre au stade IV l'amygdale, le thalamus et le claustrum. La phase limbique est associée au début des plaintes cognitives chez les patients. La phase iso-corticale est la phase ultime où les DNF s'étendent au reste du lobe temporal, pariétal et frontal. Dans cette phase le néocortex est atteint. Dans cette dernière phase, les aires associatives sont touchées (stade V). Les aires sensorielles, motrices et visuelles quant à elles sont touchées plus sévèrement au stade VI de la phase iso-corticale.

1.2.2.2 Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes ont été décrites par Alois Alzheimer en 1906. Elles sont constituées de peptides amyloïdes hydrophobes de 40 ou 42 acides aminés appelés A β 40 et A β 42, séquencés par Glenner en 1984 (Glenner and Wong 1984).

Il existe deux formes de plaques amyloïdes extracellulaires : les plaques diffuses et les plaques à noyaux denses (Figure 6A et 6B respectivement), détectables par une coloration au rouge Congo ou à la Thioflavin-S connus pour reconnaître les structures en feuillets β .

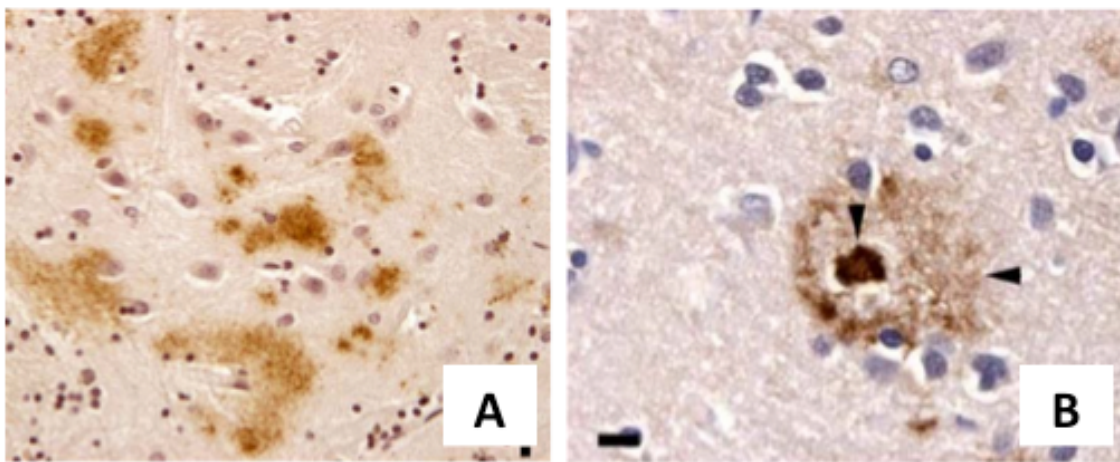


Figure 6: Morphologie des dépôts amyloïdes.

Immunomarquage anti-A β mettant en évidence les dépôts diffus. B : immunomarquage avec un anticorps anti-A β (Dako) d'une plaque amyloïde à noyau dense. Une couronne marquée de peptides A β (flèches noires) entoure le dépôt focal. Echelle : 10 μ m. Figure modifiée de Duyckaerts et al 2009.

Les plaques diffuses sont mal délimitées morphologiquement et ne sont pas reconnues par ces deux types de coloration (Delaère et al. 1990). En revanche, les plaques à noyau dense sont constituées de peptides amyloïdes prenant une conformation en feuillet β très insoluble. Les plaques amyloïdes engendrent une perturbation du réseau synaptique, la formation de neurites dystrophiques, et une perte neuronale (Knowles et al. 1999). Autour de ces plaques, la réponse inflammatoire est très présente avec un recrutement et une activation des cellules astrocytaires (Beach, Walker, and McGeer 1989; Itagaki et al. 1989) et microgliales (Rogers et al. 1988; Itagaki et al. 1989; Masliah et al. 1991; Duyckaerts, Delatour, and Potier 2009).

Plusieurs études ont montré que la durée et la sévérité de la démence ne sont pas corrélées avec la charge amyloïde cérébrale (Arriagada et al. 1992; Hyman, Marzloff, and Arriagada 1993; Gómez-Isla et al. 1997; Giannakopoulos et al. 2003; Ingelsson et al. 2004).

Outre les peptides amyloïdes, des études ont révélé que ces plaques amyloïdes étaient constituées de cholestérol (Mori et al. 2001; Girardot, Allinquant, and Duyckaerts 2003; Panchal et al. 2010) et de fragments d'apolipoprotéines E ; le transporteur du cholestérol (Jones et al. 2011) que nous aborderons plus en détails dans la partie 1.5. Une étude intéressante confirme la corrélation entre les porteurs ApoE4 et la diminution drastique du volume de l'hippocampe mais révèle également une corrélation avec de faibles taux d'Aβ42 dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la MA (Schuff et al. 2009).

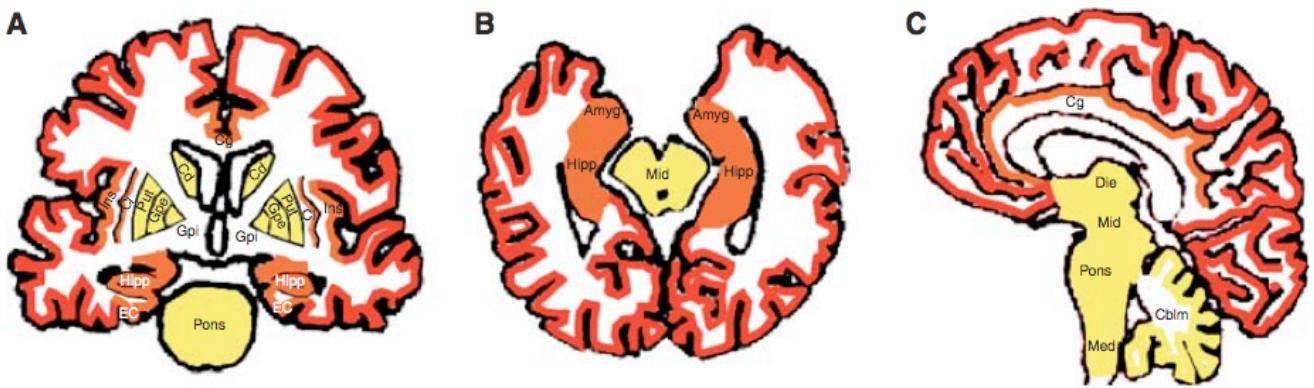


Figure 7 : Progression spatio-temporelle du dépôt des plaques amyloïdes.

Coupes cornale (A), axiale (B) et sagittale (C) du cerveau. Cinq stades de Thal de dépôts amyloïdes sont résumés. Les dépôts de peptides amyloïdes s'accumulent dans un premier temps dans les régions néocorticales (stade 1, en rouge). Par la suite les structures limbiques et allocorticales sont touchées (stade 2, en orange). Pour finir les dépôts s'accumulent dans les structures sous corticales tels que les ganglions de la base, certains noyaux du diencephale et du tronc cérébral (stade 3, en jaune). Amyg : Amygdale ; EC : Cortex entorhinal ; Hipp : Hippocampe ; Cg : Cortex cingulaire ; Cd : Noyau caudé ; Put : Putamen ; Gpe : Globus pallidus externe ; Gpi : Globus pallidus interne ; Cl : Claustrum ; Ins : Cortex insulaire ; Die : Diencephale ; Mid : Mésencéphale ; Med : Bulbe rachidien ; Cblm : Cervelet. D'après Thal et al 2002 (Serrano-Pozo et al. 2011).

La progression spatio-temporelle des plaques amyloïdes est beaucoup moins définie que celle des DNF (Figure 7). Lors de cette progression le néocortex est souvent touché. De la même manière que pour les DNF les aires primaires sensorielles, motrices et visuelles sont moins touchées que les aires associatives (Arnold et al. 1991; H. Braak and Braak 1991). Cinq stades de progression des dépôts amyloïdes ont été décrits par Thal et al. (Thal et al. 2002) :

- Stade 1 : le stade néocortical
- Stade 2 : le cortex entorhinal, l'amygdale, l'hippocampe et le cortex insulaire et cingulaire sont touchés
- Stade 3 : les noyaux sous-corticaux
- Stade 4 : les structures du tronc cérébral sont atteintes
- Stade 5 : le cervelet est atteint

1.2.2.3 Les biomarqueurs de la MA

Chez les patients avec un MCI, le trouble cognitif est débutant mais pas assez sévère pour pouvoir diagnostiquer de façon certaine la MA. À ce stade, les lésions pathologiques observées sont moins abondantes que celles retrouvées chez les patients diagnostiqués de façon certaine atteints de la MA. Le défi est donc de trouver un biomarqueur spécifique et sensible, qui permettrait de définir le début de l'apparition de la maladie et donc bien avant l'apparition des symptômes cognitifs.

À l'heure actuelle, il existe cinq biomarqueurs de la MA utilisés en clinique (Jack and Holtzman 2013): deux biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (LCR) et trois biomarqueurs correspondent à des mesures d'imagerie cérébrale. Ces biomarqueurs peuvent être divisés en deux catégories : la mesure amyloïde et la mesure de l'avancée de la neurodégénérescence.

La pathologie amyloïde se manifeste au moins 20 ans avant l'apparition des symptômes cliniques de la MA (Sperling et al. 2011; Jack and Holtzman 2013). Les taux d'A β 42 sont mesurés dans le LCR et permettent de quantifier la charge amyloïde. Ces taux diminuent dans le LCR et augmentent dans le cerveau de patients atteints par la MA (Bouwman et al. 2009; Anne M Fagan et al. 2007; Mattsson et al. 2009; Shaw et al. 2009; Visser et al. 2009). La charge amyloïde peut également être visualisée par tomographie par émission de positrons à l'aide du composé B de Pittsburgh ou encore appelé Pittsburgh compound B (TEP-PiB) (Klunk et al. 2004; Drzezga 2010; Rowe et al. 2010; Villemagne et al. 2011; Rodrigue et al. 2012; Nordberg et al. 2013). Ces deux biomarqueurs de la charge amyloïde corrént parfaitement lorsque la mesure est faite sur un même individu (Anne M. Fagan et al. 2006; Jagust et al. 2009; Tolboom et al. 2009; Weigand et al. 2011). De plus, la corrélation entre des études d'autopsies et ces biomarqueurs a permis leur validation (Strozyk et al. 2003; Ikonovic et al. 2008; Tapiola et al. 2009; Clark et al. 2011; Fleisher et al. 2011). Le TEP-

PiB constitue une avancée majeure dans le diagnostic de la MA, puisqu'il permet de mesurer *in vivo* les dépôts amyloïdes du parenchyme cérébral. Le composé de Pittsburgh, [N-méthyl-11C]-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole, est un dérivé fluorescent de la thioflavine-T qui marque uniquement les dépôts amyloïdes mais pas les DNF. Le marquage du PiB avec le carbone 11 (11C-PiB), présente une demi-vie très courte de 20 min, ce qui restreint son développement industriel. C'est la raison pour laquelle une seconde génération de traceur au fluor-18 tel que le Florbetapir F18 (18F-AV-45) a vu le jour présentant une durée de demi-vie de 110 min (Figure 8) (Wong et al. 2010; K. J. Lin et al. 2010; Choi et al. 2009).

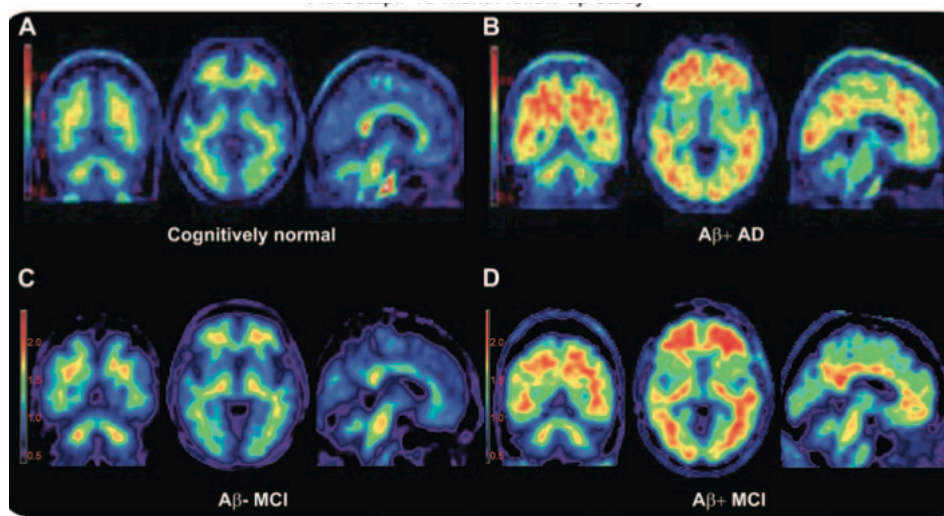


Figure 8 : Images TEP au florbetapir F18.

Les plans axiaux et sagittaux du cerveau de patients contrôles amyloïde négatif (A), de patients atteints de la MA amyloïde positif (B), de patient MCI amyloïde négatif (C) et de patients MCI amyloïde positif qui a développé la maladie durant l'étude (D) sont représentés. (Doraiswamy et al. 2012). Les zones rouges correspondent aux dépôts amyloïdes marqués par le traceur F18. Les zones bleues et vertes représentent des zones amyloïdes négatives.

La neurodégénérescence est caractérisée par la perte progressive de neurones et de leur prolongement. Elle est accompagnée d'une perte de la fonction neuronale. Trois biomarqueurs majeurs permettent d'observer la neurodégénérescence neuronale : l'augmentation des taux de la protéine tau phosphorylée et non phosphorylée dans le LCR (A.M Fagan et al. 2009; Mattsson et al. 2009; Shaw et al. 2009; Visser et al. 2009), l'atrophie cérébrale par imagerie à résonance magnétique IRM (Hua et al. 2008; Morra et al. 2008; Morra et al. 2009; Desikan et al. 2009; Vemuri et al. 2009; Dickerson, Wolk, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative 2012), et enfin un hypométabolisme glucidique détectable en TEP à l'aide du radio traceur fluorodeoxyglucose (FDG TEP) (Jagust et al. 2010). L'hypométabolisme glucidique

qui affecte les aires corticales associatives primaires (Chételat et al. 2008), permet de discriminer les patients MA des témoins et distingue les MCI à risque de conversion vers une MA (Mosconi et al. 2004) (Figure 9).

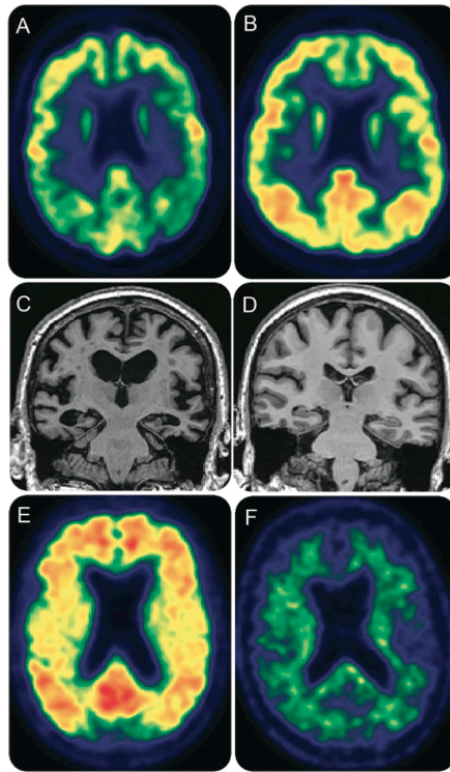


Figure 9 : Images FDG-TEP de patients.

A : Images FDG-PET d'un homme de 75 ans avec une démence de type Alzheimer présentant un hypometabolisme de l'isocortex pariéto-temporal latéral et pariéto-médial avec une préservation du métabolisme frontal, caractéristique d'un individu amnésique à multidomaines, diagnostiqué positif pour la MA. **B** : Images FDG-TEP d'un homme de 71 cliniquement normal présentant une absorption uniforme du FDG dans tout l'isocortex. **C** : Image IRM d'un homme de 71 ans atteint de la MA. L'atrophie est présente dans l'allocortex temporo-médial et dans l'isocortex temporal latero-basal, ce qui est caractéristique d'un individu amnésique à multidomaines de la MA. **D** : Image IRM d'une femme de 71 ans sans atrophie, cliniquement diagnostiquée comme « normale ». **E** : Image TEP-PiB d'une femme de 71 ans avec une démence de type Alzheimer. L'absorption du composé est présente au niveau de l'isocortex. **F** : Image TEP-PiB d'un homme de 93 ans cliniquement normal et affichant aucune absorption du composé Pittsburgh dans l'isocortex (Jack et al. 2016).

Le développement des biomarqueurs a permis l'établissement de nouveaux critères tels que l'imagerie, pour le diagnostic précoce de la MA proposés en 2007 (Dubois et al. 2007).

1.3 Physiopathologie de la MA

Dans ce chapitre nous étudierons un peu plus en détails les protéines impliquées dans la pathologie et les voies aboutissant à leur formation.

1.3.1 Le peptide amyloïde

Le peptide amyloïde est issu de son précurseur l'APP: l'Amyloid precursor protein, séquencé en 1987 (J. Kang et al. 1987). Le locus du gène de l'APP se situe sur le chromosome 21, et peut générer, suite à un épissage alternatif, trois isoformes : APP695, APP751 et APP770. L'APP695 est l'isoforme retrouvée majoritairement dans les neurones contrairement aux deux autres isoformes qui sont largement exprimées dans toutes les cellules du corps. L'APP est une protéine transmembranaire de type I et peut subir deux voies de clivages associées à des enzymes spécifiques : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Figure 10).

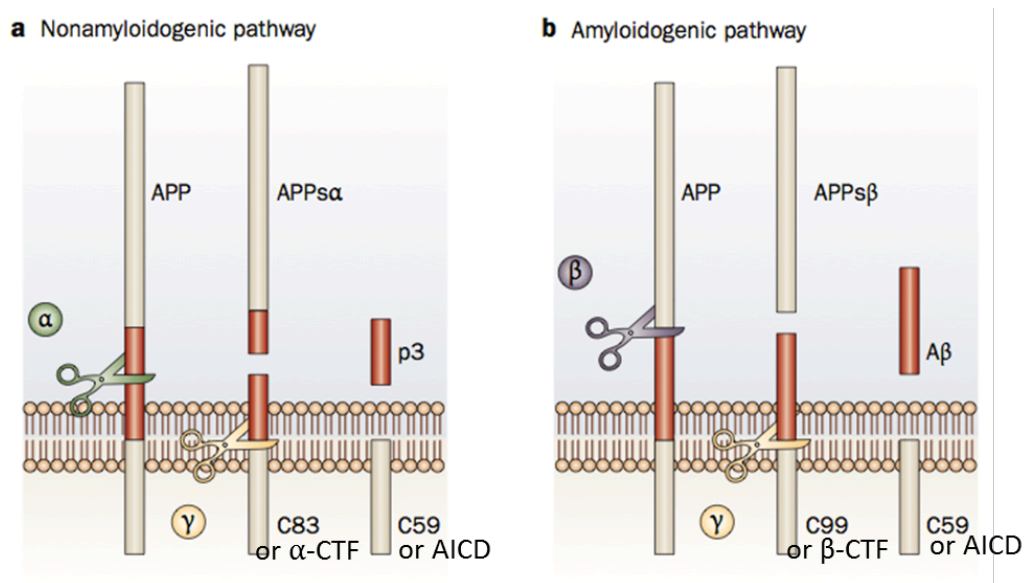


Figure 10 : Les voies de clivage de l'APP : non-amyloïdogénique et amyloïdogénique.

L'APP transmembranaire représentée en gris est clivée par l' α -sécrétase (a) et la β -sécrétase en vert et en violet (b) respectivement. Les peptides p3 et A β (en rouge) sont libérés après le clivage de la γ -sécrétase (en jaune). (Figure modifiée de De Strooper, Vassar, and Golde 2010).

1.3.1.1 Le clivage α -sécrétase de l'APP : la voie non-amyloïdogénique

Le clivage de l'APP par l' α -sécrétase est majoritaire en condition physiologique (Sisodia et al. 1990; Seubert et al. 1993; Weidemann et al. 1999). Trois enzymes appartiennent à la famille des protéines métalloprotéinases et possèdent une activité α -sécrétase : ADAM10, ADAM17 et ADAM9 (Buxbaum et al. 1998).

Le clivage par l' α -sécrétase se fait au niveau de la membrane plasmique (Kojro et al. 2001) et intervient sur la séquence du peptide A β . L' α -sécrétase libère un peptide N-terminal extracellulaire sAPP α , laissant à la membrane plasmique le peptide C-terminal C83 ou encore

appelé α -CTF (de l'anglais « C-terminal fragment »). De nombreuses études convergent vers un rôle neuroprotecteur de sAPP α . *In vitro* sAPP α permet l'induction de la voie de survie Akt (Milosch et al. 2014). *In vivo*, sAPP α réduit les lésions cérébrales traumatiques par injections intra cérébroventriculaires chez des souris APP KO (Corrigan et al. 2012). La surexpression de sAPP α par injection lentivirale chez des souris APP/PS1 Δ E9, restaure la plasticité synaptique, réduit les déficits cognitifs et les plaques amyloïdes dans l'hippocampe et le cortex (Fol et al. 2016). De plus, une étude intéressante montre que les souris transgéniques surexprimant ADAM10 présentent une augmentation de la synaptogénèse corticale (Bell et al. 2008).

Une fois clivé par l' α -sécrétase, le fragment C83 subit un second clivage par le complexe enzymatique γ -sécrétase. La γ -sécrétase clive C83 libérant ainsi le peptide P3 soluble et le domaine intracellulaire de l'APP (de l'anglais AICD : « APP IntraCellular Domain ») (B De Strooper et al. 1998). Le complexe enzymatique de la γ -sécrétase est constitué de quatre sous-unité : la préséniline 1 ou la préséniline 2, la nicastrine, Aph-1 (Anterior Pharynx defective-1) et Pen-2 (Presenilin-Enhancer-2) (Edbauer et al. 2003; Fraering, LaVoie, et al. 2004; Fraering, Ye, et al. 2004; Kimberly et al. 2003; Toru Sato et al. 2007). Son action est délicate puisqu'elle doit hydrolyser l'APP dans son domaine transmembranaire et hydrophobe (Grziwa et al. 2003).

Les présénilines 1 et 2 constituent les sous-unités catalytiques de ce complexe (Christian Haass and Steiner 2002).

1.3.1.2 Le clivage de l'APP par la β -sécrétase: la voie amyloïdogénique

Dans la MA, cette voie de clivage est majoritaire et conduit à la formation du peptide amyloïde. L'APP subit le clivage séquentiel de la β -sécrétase (Hussain et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999) puis de la γ -sécrétase. La β -sécrétase, ou encore appelée BACE1 (de l'anglais « β -APP cleaving enzyme ») libère le fragment soluble extracellulaire sAPP β , et le fragment C-terminal C99 ou encore appelé β -CTF. Cette première étape de clivage se déroule majoritairement dans les endosomes où le pH acide est favorable à l'activité de la β -sécrétase. Le fragment C-terminal C99 est à son tour clivé par la γ -sécrétase libérant ainsi le peptide A β et l'AICD. La γ -sécrétase possède principalement deux sites de clivages : le site ϵ et le site γ . Ainsi la γ -sécrétase libère l'AICD après clivage au niveau du site ϵ , et aboutit à la libération

de peptides A β de différentes tailles par clivages successifs au niveau du site γ . Les formes majoritaires de peptides sont les peptides de 40 et 42 acides aminés (A β 40 et A β 42 respectivement). En condition pathologique de la MA, le peptide A β 42 est majoritaire et le ratio A β 42/40 augmente.

L'AICD est donc produit à partir de la voie amyloïdogénique et non-amyloïdogénique avec une séquence peptidique identique quel que soit la voie. Néanmoins son rôle diffère selon la voie d'origine. L'AICD produit à partir de la voie de clivage de la β -sécrétase, forme un complexe AICD/FE65/TIP60 (Cao and Südhof 2001), puis est transloqué dans le noyau où il jouera le rôle de facteur de transcription en se liant au promoteur du gène de la neprylisine impliqué dans la dégradation de l'A β (Belyaev et al. 2010). En revanche l'AICD produit à partir du clivage de l' α -sécrétase, est dégradé dans le cytosol (Edbauer et al. 2002). Outre le gène de la neprylisine, l'AICD régule de nombreux autres gènes tels que : p53 impliqué dans la mort neuronale (Alves da Costa et al. 2006), la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3 β) (Von Rotz et al. 2004; F. Zhou et al. 2012; Ryan and Pimplikar 2005) ou encore les récepteurs LRP1 (Q. Liu et al. 2007). Le rôle de l'AICD reste controversé du fait des différents modèles cellulaires utilisés dans les études, ainsi que des différentes isoformes d'APP exprimées. Les souris transgéniques surexprimant l'AICD révèlent une suractivation de la kinase GSK-3 β , une hyperphosphorylation de tau et des déficits cognitifs (Ghosal et al. 2009).

Le peptide P3 peut s'agréger sous forme fibrillaire mais est incapable de former des oligomères stables (Dulin et al. 2008) et n'a aucun effet sur la fonction synaptique (Walsh et al. 2002).

Récemment une nouvelle voie physiologique du clivage de l'APP a été découverte, générant de nouveaux fragments protéolytiques capables d'inhiber l'activité neuronale au sein de l'hippocampe. Ce clivage est appelé le clivage η (Willem et al. 2015). Les auteurs ont identifié des fragments C-terminaux de 30 KDa (à plus haut poids moléculaires que les CTF- α et les CTF- β décrits précédemment) appelés CTF- η . Ce clivage est médié par les protéines métalloprotéases matricielles MT5-MMP correspondant à une activité η -sécrétase. L' η -sécrétase clive entre la position 504 et 505 de l'APP695, libérant le fragment soluble de 80KDa sAPP η et le fragment C-terminal CTF- η . Le fragment CTF- η est à son tour clivé par la β -sécrétase et l' α -sécrétase libérant les peptides A η - β et A η - α .

Le clivage de l' η -sécrétase est prédominant face au clivage conduisant à la libération du peptide amyloïde. L'inhibition de la β -sécrétase conduit à l'accumulation des fragments CTF- η et A η - α , ainsi qu'à l'inhibition de la potentialisation à long terme (LTP) de l'hippocampe chez des souris transgéniques APP/PS1 (Willem et al. 2015).

Une étude récente montre que les souris transgéniques MT5-MMP déficientes, présentent de très importantes réductions de la charge amyloïde, et de la neuro-inflammation avec une amélioration de la mémoire spatiale sans changement de l'activité des sécrétases α , β et γ (Baranger et al. 2016).

1.3.2 La protéine tau

Il existe 6 isoformes de la protéine tau dont la longueur varie entre 352 et 441 acides aminés, avec un poids moléculaire qui varie entre 45 et 65 KDa (Buée et al. 2000). Cette protéine hautement flexible et mobile est constituée de trois régions : une région N-terminale acide, une région riche en prolines et une région C-terminale basique, lui permettant d'avoir différentes interactions (avec les microtubules ou d'autres partenaires) (Sergeant et al. 2008).

La région N-terminale est appelée « domaine de projection » et ne se lie pas aux microtubules mais peut interagir avec la membrane plasmique (Hirokawa, Shiomura, and Okabe 1988; Brandt, Léger, and Lee 1995). La région centrale (acides aminés 150 à 250) est appelée « domaine riche en prolines », car elle présente de nombreux motifs serine-proline ou thréonine-proline, qui sont la cible de kinases PDPK « les protéines kinases dirigées sur les prolines ». Elle possède également des motifs reconnus par des protéines contenant un ou plusieurs domaines SH3 (*Src homology 3*), que l'on appelle motifs PXXP (proline-X-X-proline) (Mandelkow and Mandelkow 2012).

La protéine tau peut subir différentes modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, glycosylation, glycation, isomérisation des prolines, troncation, nitration, polyamination, etc. Cependant, la phosphorylation est la modification post-traductionnelle majeure ciblant un grand nombre de sites sur la protéine (Martin, Latypova, and Terro 2011).

1.3.3 L'hypothèse de la cascade amyloïde

Tau est impliquée dans la croissance neuritique, la polarisation et la migration neuronale (Harada et al. 1994; Takei et al. 2000; Dawson et al. 2001). Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'hyperphosphorylation de Tau induit une diminution de sa liaison aux microtubules, entraînant leur déstabilisation (Alonso et al. 1994; Sontag et al. 1996). Les neurofibrilles ne semblent cependant pas être les formes responsables de la neurotoxicité (Wittmann et al. 2001; Gendreau and Hall 2013). Les formes intermédiaires, les oligomères, conduisent à la formation des DNF et seraient donc responsables de la corrélation existant entre les déficits cognitifs observés chez les patients et la progression spatio-temporelle des lésions (Arriagada et al. 1992; Grober et al. 1999; Walker et al. 2013). De plus, ces oligomères sont retrouvés chez les patients atteints de la MA (Patterson et al. 2011). Le croisement des souris transgéniques APP avec des souris transgéniques tau augmente l'accumulation de tau sans altérer le dépôt d'A β (Lewis et al. 2001). Le croisement de souris transgéniques APP et de souris Knock out pour tau conduit à une réduction des déficits comportementaux (Roberson et al. 2007). Le traitement de cultures de neurones avec des oligomères solubles d'A β isolés à partir de cortex de cerveaux de patients atteints de la MA, induit une dystrophie neuritique et une hyperphosphorylation de tau (Jin et al. 2011). Mais la suppression de tau ne révèle pas les mêmes résultats. L'hypothèse de la cascade amyloïde a vu le jour, mettant en évidence que la pathologie amyloïde serait initiatrice de la maladie et conduirait par la suite à la pathologie tau (J. A. Hardy and Higgins 1992; J. Hardy and Selkoe 2002) (Figure 11). Comme le décrit la figure 11, les éléments déclencheurs de la cascade amyloïde sont les formes dominantes (avec la présence des mutations sur les gènes codant pour l'APP et les présénilines) et sporadiques de la MA (présentant un défaut de clairance d'A β).

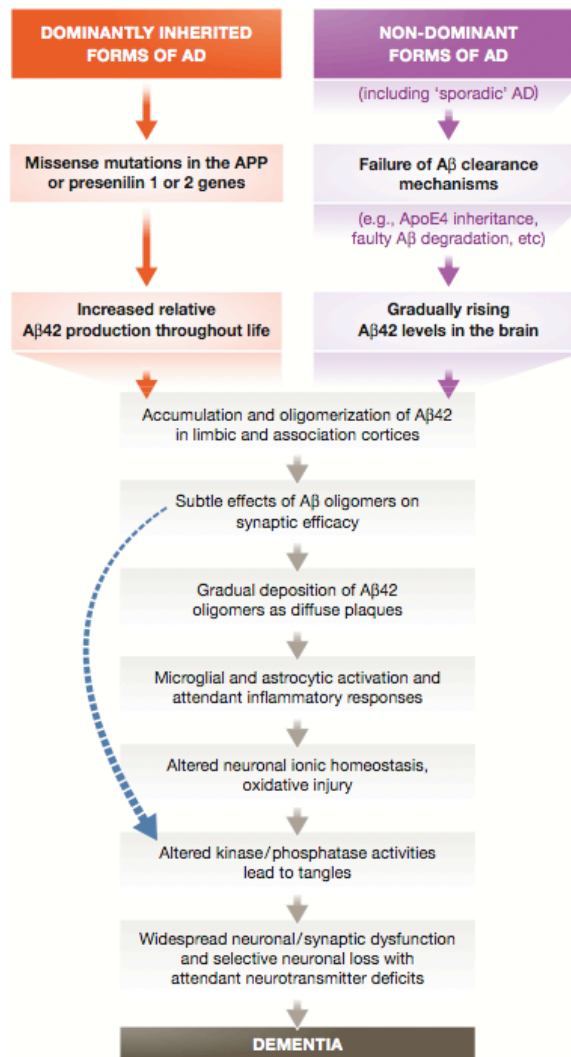


Figure 11 : Séquence d'évènements pathogéniques majeurs conduisant à la MA suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde (Selkoe and Hardy 2016).

La flèche bleue indique que les oligomères d'Aβ pourraient directement altérer les synapses et les neurites des neurones en plus d'activer la microglie et les astrocytes.

1.4 Les formes familiales et sporadiques de la MA

1.4.1 Les formes familiales

1.4.1.1 Les présénilines

Deux gènes, découverts en 1995, sont impliqués dans les formes familiales de la MA : le gène de la Préséniline-1 (PSNEN1) et le gène de la préséniline-2 (PSEN2) situés sur le chromosome 14 et 1 respectivement (Levy-Lahad et al. 1995; Rogaev et al. 1995). Il existe 238 mutations de la préséniline-1 et 45 mutations de la préséniline-2 répertoriées sur le site www.alzforum.org.

Ces mutations affectent les taux d'Aβ40 et 42, en augmentant le ratio d'Aβ42/40 dans des fibroblastes dérivés de patients (Scheuner et al. 1996). Cela a été montré également par surexpression des mutants de préséniline dans des lignées cellulaires (Borchelt et al. 1996; Citron et al. 1997) et dans les cerveaux de souris transgéniques APP/PS1 (Borchelt et al. 1996; Borchelt et al. 1997; Duff et al. 1996; Citron et al. 1997). Contrairement aux mutations de l'APP qui augmentent généralement la production de peptides amyloïdes, les mutations des présénilines diminuent la production d'Aβ40 (Suzuki et al. 1994). Les mutations engendrent une perte de fonction des présénilines, induisant un clivage incomplet des fragments CTFβ générant moins de peptides 40 et plus de 42 (Qi et al. 2003; Yagishita et al. 2006). C'est en 1998, que De Strooper et al. mettent en évidence le rôle des présénilines à savoir le clivage protéolytique de l'APP (B De Strooper et al. 1998).

1.4.1.2 Les mutations de l'APP

Plusieurs mutations sont répertoriées sur le site Alzforum.org, avec 52 mutations sur le gène de l'APP liées à la MA (www.alzforum.org). La plupart de ces mutations sont adjacentes aux sites de clivages de la β et γ-sécrétase (Figure 12).

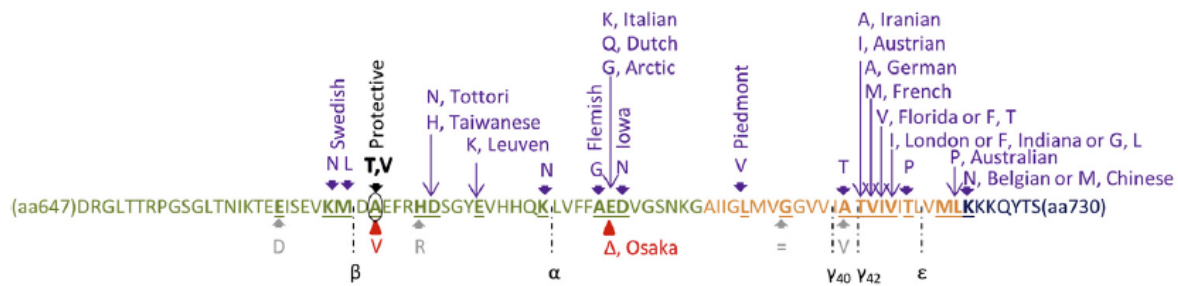


Figure 12 : Les mutations Familiales sur l'APP (acides aminés 647 à 730).

Les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire sont indiqués en vert, orange et bleu foncé respectivement. Les mutations familiales sont indiquées en violet (Cacace, Slegers, and Van Broeckhoven 2016).

Nous aborderons cette partie en classant les mutations selon leur localisation sur la séquence de l'Aβ. Le tableau récapitulatif (Tableau 2), résume les différentes mutations.

1.4.1.2.1 Les mutations présentes en dehors de la séquence A β

La mutation suédoise KM670/671NL (de l'anglais "Swedish") et la mutation londonienne V717I (de l'anglais "London") se trouvent en dehors de la séquence de l'A β , et sont les mutations les plus utilisées *in vitro*. La mutation suédoise (Mullan et al. 1992) se situe près du site de clivage de la β -sécrétase et engendre une augmentation de peptides extracellulaires A β 40 et A β 42 (Scheuner et al. 1996; Johnston et al. 1994; Citron et al. 1994; Citron et al. 1992). La mutation London identifiée en 1991 (Goate et al. 1991) augmente le ratio A β 42/A β 40 sans affecter les taux d'A β 40 (Eckman et al. 1997; De Jonghe et al. 2001). Cette mutation se situe, quant à elle, près du site de clivage de la γ -sécrétase.

1.4.1.2.2 Les mutations présentes sur la séquence A β

Contrairement à ces deux exemples de mutations, d'autres mutations se situent sur la séquence même du peptide amyloïde (Figure 13). Quelques-unes de ces mutations, que je développerai dans ce chapitre, concernent mes travaux de thèse sur le site de liaison du cholestérol et de l'APP.

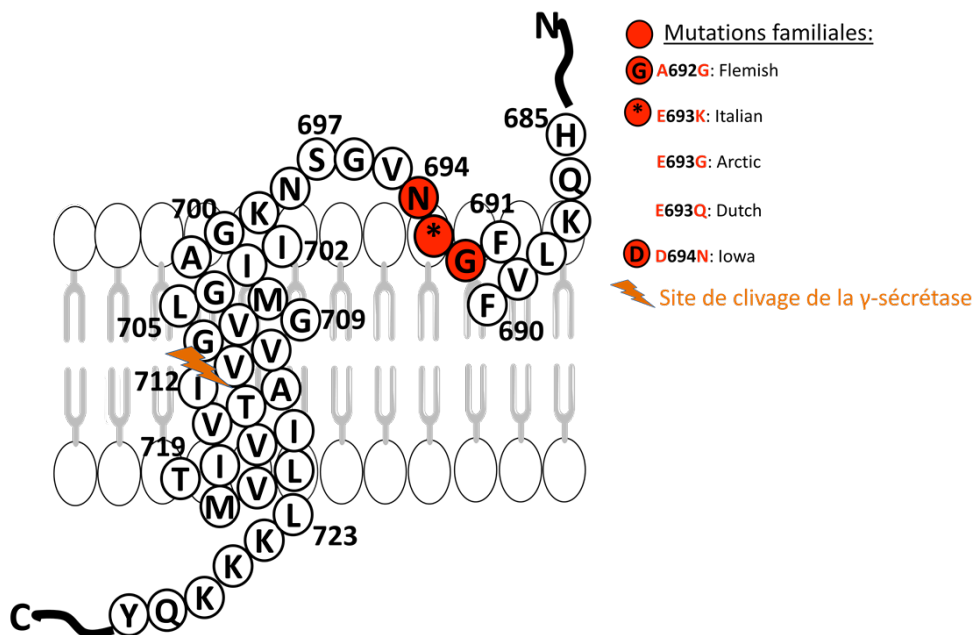


Figure 13 : Les mutations familiales de l'APP.

Les mutations familiales, situées dans le site de liaison du cholestérol de l'APP, abordées dans ce chapitre sont indiquées en rouge. Trois mutations se situent à la position 693 indiquées par un astérisque. Le site de clivage de la γ -sécrétase est indiqué en orange.

La mutation Dutch (E693Q) est la première mutation de l'APP découverte en 1990 (Levy et al. 1990), appartenant à un groupe de maladies familiales rares du système nerveux central (SNC) appelée Hémorragies Cérébrales Héritaires avec Amylose (HCHAA ou de l'anglais « Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis Dutch-type » HCHWA-D). Cette mutation est caractérisée par un dépôt important de peptides amyloïdes vasculaire que l'on appelle angiopathie amyloïde cérébro-vasculaire (AAC). Ce dépôt au niveau des artères cérébrales et des capillaires, peut entraîner une rupture ou un rétrécissement vasculaire, et donc un arrêt vasculaire cérébral (AVC) hémorragique ou non-hémorragique (Wattendorff et al. 1982; Luyendijk and Bots 1986; Panegyres et al. 2005).

Trois autres mutations sont découvertes à la même position : la mutation Arctique E693G (Nilsberth et al. 2001a), la mutation Italienne E693K (Bugiani et al. 2010), et la mutation (délétion) Osaka E693Δ (Tomiya et al. 2008). Une autre mutation se trouvant dans la même région a été découverte en 1994 : la mutation Flemish A692G (C Haass et al. 1994).

Toutes ces mutations se trouvent au milieu de la séquence du peptide amyloïde et causent des AAC, exceptées deux mutations : les mutations Arctique et Osaka. Il est très intéressant de voir que ces mutations ne se comportent pas de la même manière.

Les patients avec des HCHAA de type Dutch (E693Q) ont une forme sévère d'AAC présente cliniquement entre 45 et 60 ans. Les survivants au premier AVC (ce qui représente environ 60% des patients), sont victimes d'autres AVC conduisant à des déficits cognitifs. Les patients présentent de larges dépôts amyloïdes au niveau des artères cérébrales et du parenchyme cérébral ainsi que des structures similaires aux plaques diffuses que l'on retrouve fréquemment chez les patients atteints de la MA (Miravalle et al. 2000; Wattendorff et al. 1982). La mutation Dutch affecte la structure du peptide engendrant la formation de fibrilles beaucoup plus rapidement que la mutation Italienne (Baumketner, Krone, and Shea 2008; Miravalle et al. 2000), mais également d'oligomères (Grant et al. 2007). Les souris transgéniques exprimant la mutation Dutch exhibent une augmentation des dépôts vasculaires amyloïdes et une diminution de ces dépôts dans le parenchyme cérébral par rapport à des souris n'exprimant pas cette mutation (Herzig et al. 2004; Herzig et al. 2009). *In vitro*, une étude intéressante montre que cette mutation ne semble pas affecter la production d'Aβ contrairement à la mutation Flemish connue pour augmenter les taux d'Aβ40 et 42 extracellulaires (De Jonghe et al. 1998). Par ailleurs, Tian et al décrivent en 2010 un « domaine inhibiteur » de l'APP dans lequel la mutation Flemish suffit à elle seule pour

promouvoir une augmentation de peptides A β 40 et 42, en modulant l'activité de la γ -sécrétase (Tian et al. 2010).

Contrairement à la mutation Dutch E693Q, la mutation Arctique E693Q ne provoque pas d'AAC mais celle-ci est caractérisée par un important dépôt de plaques amyloïdes dans le cerveau.

Les patients avec des HCHAA de type Italienne montrent de récurrents AVC hémorragiques et meurent entre 62 et 75 ans. Ils présentent, tout comme les patients portant la mutation Dutch, de larges dépôts amyloïdes vasculaires (Nilsberth et al. 2001a; Bugiani et al. 2010). Seules 2 études ont été publiées sur ces cas à ce jour. Les patients porteurs de la mutation Osaka E693 Δ (délétion de l'acide glutamique) n'ont pas de dépôts amyloïdes au niveau du parenchyme cérébral (Tomiyama et al. 2008). Les peptides mutés E693 Δ ne développent pas de fibrilles *in vitro* mais favorisent la formation d'oligomères (Nishitsuji et al. 2009; Tomiyama et al. 2008). Les souris transgéniques exprimant cette mutation présentent une accumulation intra neuronale d'oligomères à 8 mois mais pas de plaques séniles avant 24 mois. Cette accumulation intra neuronale d'oligomères s'accompagne d'une hyperphosphorylation de tau, d'une activation microgliale et astrocytaire ainsi que d'un déficit des capacités de mémorisation à 8 mois (Tomiyama et al. 2010).

Toutes ces informations évoquées nous amènent donc à nous demander comment ces mutations qui génèrent des AAC, n'induisent pas de dépôts amyloïdes dans le parenchyme cérébral.

Si toutes ces mutations sont dominantes, des études mettent en évidence des mutations récessives telle que la mutation A673V. Cette mutation est également située sur la séquence de l'A β , à deux acides aminés près du site de clivage de la β -sécrétase. Elle forme à l'état hétérozygote, des complexes instables avec le peptide amyloïde wild-type conduisant à l'inhibition de l'amyloïdogénèse et de la toxicité, alors qu'à l'état homozygote le peptide muté reste stable et très toxique. La mutation de l'Alanine en Valine à cette position (693) permettrait à l'APP de devenir un meilleur substrat pour la β -sécrétase. Ainsi, *in vitro*, la surexpression de cette mutation engendre une augmentation des peptides A β 40 et A β 42 mais sans changement du ratio A β 40/A β 42 (Di Fede et al. 2009). D'autres études confirment l'augmentation de la production de peptides A β 40 et 42 dans des cultures primaires de neurones de souris exprimant cette mutation (Maloney et al. 2014; Benilova et al. 2014). Des

autopsies de patients portant cette mutation à l'état homozygote révèlent des plaques amyloïdes et des AAC en quantité abondante dans le cortex (Giaccone et al. 2010).

À la même position, une seconde mutation récessive sur l'APP (A673T), caractérisée comme étant protectrice, est découverte pour la première fois en 1993 chez un patient non-atteint par la MA (Peacock et al. 1993). L'autopsie révèle de très faibles quantités de peptides amyloïdes dans le parenchyme cérébral et dans les capillaires. En 2012, cette mutation a été retrouvée chez plusieurs individus islandais âgés de 80 à 100 ans sans troubles cognitifs (Jonsson et al. 2012). La surexpression de cette mutation protectrice dans des cellules HEK293, réduit d'environ 40% la production d'A β 40 et d'A β 42 par rapport aux cellules exprimant l'APP wild-type. En revanche la surexpression de la mutation A673V (décrite dans le paragraphe précédent), augmente la production de peptides A β 40 et A β 42. La β -sécrétase clive 50% moins les peptides portant la mutation A673T par rapport aux peptides portant la mutation A673V, ce qui confirme que la thréonine rend l'APP moins favorable au clivage de la β -sécrétase. En effet, ceci est confirmé par une augmentation des fragments solubles sAPP α et une diminution des sAPP β , mettant en évidence la favorisation de la voie non-amyloïdogénique. En plus de diminuer la production de peptides A β , la mutation A673T réduit l'agrégation des peptides mutés A β 42 par rapport aux peptides wild-type (Maloney et al. 2014) et A β 40 (Benilova et al. 2014).

Localisation	Mutation	Phénotype	nom	A β
En dehors de la séquence de l'A β	KM670/671NL	MA	Swedish	Augmente l'A β total (40 et 42)
	V717I	MA	London	Augmente le ratio A β 42/40
Sur la séquence de l'A β , près du site de clivage	A673V	MA (récessive)	Icelandic	<u>Homozygote</u> : augmente l'agrégation et la formation de fibrilles <u>Hétérozygote</u> : non-amyloïdogénique
	A673T	MA (récessive, Protectrice)		Diminution d'A β 40 et 42
Au milieu de la séquence de l'A β	A692G	AAC	Flemish	Augmente A β 40 et 42
	E693 Δ	MA	Osaka	Formation d'oligomères d'A β
	E693G	MA	Arctic	Diminue l'A β 42
	E693K	AAC	Italian	Diminue l'A β 42, pas d'effet sur l'A β 40
	E693Q	HCHAA-D*	Dutch	Formation de fibrilles et d'oligomères d'A β Pas d'effet sur la production d'A β

Tableau 2 : Phénotype des mutations familiales de l'APP.

Les mutations sont classées selon leur position sur la séquence de l'A β (en bleu, vert et orange). AAC : angiopathie amyloïde cérébro-vasculaire, HCHAA-D* : Hémorragies cérébrales héréditaires avec amylose de type Dutch accompagnée d'une angiopathie amyloïde cérébro-vasculaire AAC, MA : Maladie d'Alzheimer.

Toutes ces mutations présentent des caractéristiques différentes, et se situent au niveau du site de liaison du cholestérol de l'APP décrit par Beel et al en 2008, que nous aborderons dans le chapitre 1.8. Les caractéristiques différentes pourraient s'expliquer par un changement de conformation de l'APP, qui modifierait son clivage par les sécrétases et par une implication d'une interaction différente avec les lipides, en particulier le cholestérol.

1.4.2 Les formes sporadiques

Les formes sporadiques de la MA représentent 99% des cas et apparaissent plus tardivement que les formes familiales (après 60 ans). La MA est une pathologie multifactorielle, qui en plus d'inclure des facteurs environnementaux que nous avons cités dans le paragraphe 1.1, prend en compte des facteurs génétiques que je vais décrire dans la partie suivante.

1.4.2.1 Facteurs de risque génétiques

Les études GWAS (Genome Wide Associated Studies), ont montré l'association de plusieurs gènes à la MA par des approches visant à comparer un grand nombre de polymorphismes nucléotidiques chez des patients atteints de la MA sporadique et des contrôles. Ainsi, des gènes candidats, impliqués dans l'endocytose tels que BIN1 (gène intégrateur de pontage 1 ou encore appelé amphiphysine II) et PICALM (le gène de la protéine d'assemblage des clathrines liées au phosphatidylinositol) ont été décrits par ces études GWAS (Hu et al. 2011; Harold et al. 2009).

D'autres gènes tels que CD2AP, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, ABCA7, CD33 et CR1 ont été associés au risque de la MA (Hollingworth et al. 2011; Lambert et al. 2009; Naj et al. 2011). Le gène MS4A2 code pour la sous-unité β des récepteurs de l'immunoglobuline E de haute affinité (Kinet et al. 1988). Le gène du cluster de différenciation 33 (CD33) fait partie de la famille Siglec (lectines de type immunoglobulines fixant l'acide sialique). Les sous-groupes de monocytes et de neutrophiles expriment le CD33 favorisant les interactions cellule-cellule et permettant la régulation du système immunitaire (Crocker, Paulson, and Varki 2007) (Hollingworth et al. 2011). CD33 agit comme un récepteur endocytosique permettant l'endocytose par un mécanisme clathrine-independent. (Tateno et al. 2007). CD2AP est un adaptateur moléculaire impliqué dans la régulation de l'endocytose médiée par les récepteurs tels que les récepteurs aux facteurs de croissance (Lynch et al. 2003).

Plusieurs gènes sont suspectés d'être associés à la MA, tels que les gènes connectés au métabolisme de l'APP ou du peptide amyloïde (SORL1), ou encore les gènes connectés au métabolisme du cholestérol tel que CYP46A1 (E. A. Papassotiropoulos 2003; S. L. Ma et al. 2006; Y. Li et al. 2006).

Outre CYP46A1, d'autres gènes impliqués dans l'efflux et le transport du cholestérol (tels que le gène de la clusterine CLU, ou encore le gène du transporteur ABCA7) ont donc été associés à la MA (Harold et al. 2009; Lambert et al. 2009; Hollingworth et al. 2011). Le transport du cholestérol est médié par un transporteur : l'ApoE. L'allèle $\epsilon 4$ du gène Apolipoprotéine E (APOE), situé sur le chromosome 19, constitue le principal facteur de risque génétique de la maladie identifié à l'heure actuelle (Saunders et al. 1993; Amouyel et al. 1993).

L'APOE est le principal transporteur du cholestérol cérébral et existe sous trois isoformes : E2, E3 et E4. Les différences entre ces 3 isoformes sont limitées à deux résidus, l'arginine ou la cystéine, sur deux positions : 112 et 158.

Les individus porteurs d'une copie de l'allèle $\epsilon 4$ ont un risque de développer la MA 2 à 3 fois plus élevé et 12 fois plus élevé pour les individus présentant deux copies de l'allèle $\epsilon 4$ (Corder et al. 1993). De plus, l'allèle $\epsilon 2$ est décrit comme étant protecteur (Farrer et al. 1997; Corder et al. 1994). L'allèle $\epsilon 3$ est le plus fréquent dans la population générale (77.9% contre 13.7 et 8.4% pour les allèles $\epsilon 4$ et $\epsilon 2$ respectivement) (C.-C. Liu et al. 2013; Farrer et al. 1997). Chez les individus homozygotes $\epsilon 4$, la fréquence de la maladie est de 91% et celle-ci est détectée cliniquement à 68 ans. Chez les individus hétérozygotes $\epsilon 4$, la fréquence de la MA est de 71% et l'apparition de la maladie intervient dès 76 ans. Chez les individus non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ la fréquence et l'âge sont de 20% et 84 ans (William Rebeck et al. 1993; Corder et al. 1993). Mais l'APOE ne suffit pas à lui seul à promouvoir la maladie d'Alzheimer.

En résumé, on distingue donc plusieurs classes de gènes liés à un risque plus élevé de développer la MA :

- Les gènes impliqués dans l'endocytose : PICALM, BIN1, CD33 et CD2AP
- Les gènes impliqués dans le système immunitaire : CR1, CD33, EPHA1 et MS4A6A
- Les gènes impliqués dans l'efflux et le transport du cholestérol : APOE, ABCA7, CLU

Mais de nombreux autres gènes sont liés à la MA et sont représentés dans la figure 14 ci-dessous :

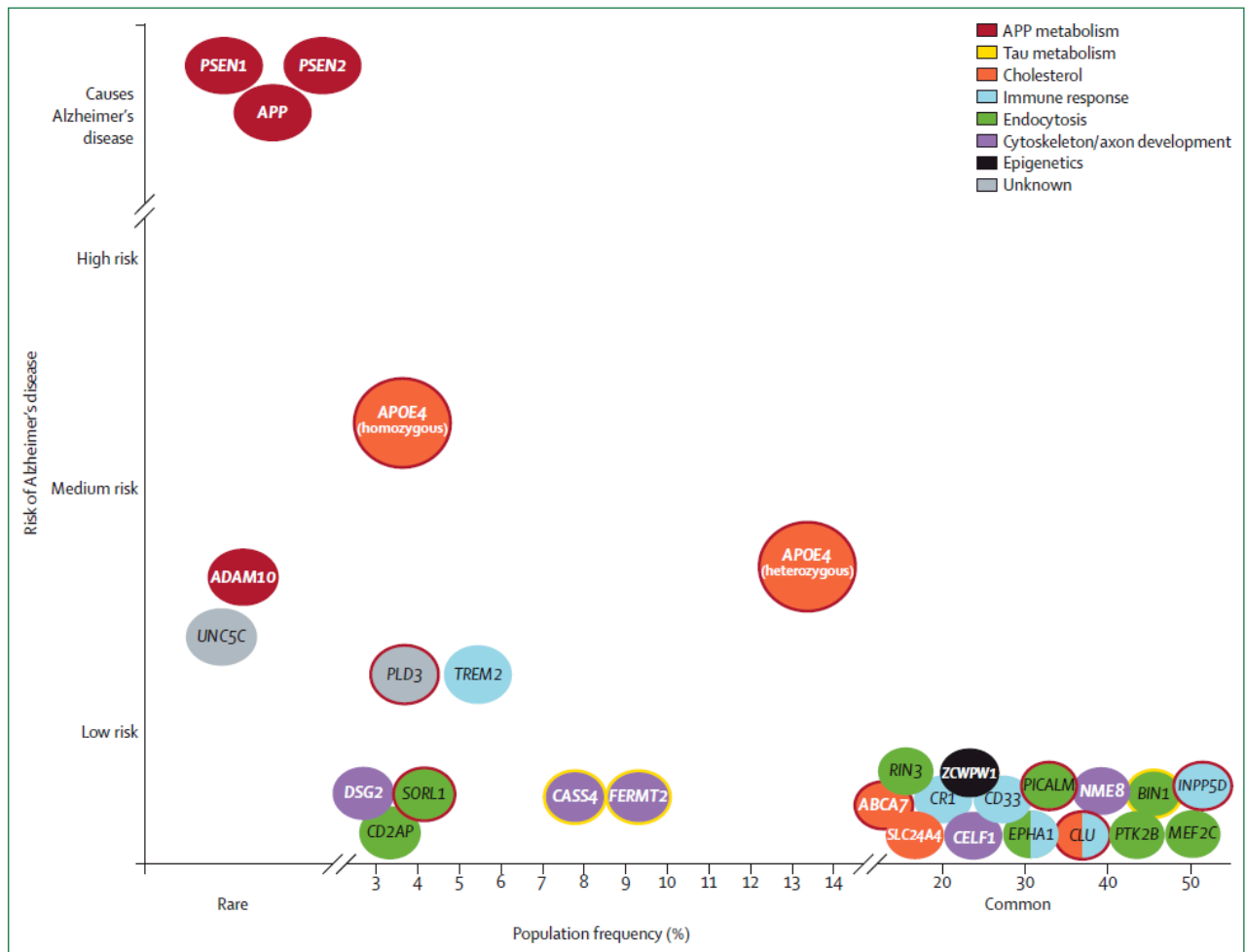


Figure 14 : Vue d'ensemble schématique des gènes associés à la MA.

Les couleurs représentent les voies dans lesquelles ces gènes sont impliqués. Les gènes connus pour affecter le métabolisme de l'APP et de tau sont entourés en rouge et en jaune respectivement. La présence de deux couleurs indique que le gène pourrait avoir un rôle dans différentes voies biologiques. Les gènes ont été classés selon l'intensité du risque pour la MA (axe des ordonnées) et la fréquence de population concernée (axe des abscisses). (Scheltens et al. 2016; Karch and Goate 2015).

1.5 L'ApoE4 : un facteur de risque majeur de la MA

Nous avons évoqué dans le chapitre précédent que des facteurs de risque génétiques sont impliqués dans la MA. L'ApoE est le facteur de risque majeur de développer la MA. Cette apolipoprotéine permet le transport du cholestérol synthétisé par les astrocytes vers les neurones. L'ApoE est impliquée dans plusieurs actions biologiques impliquant plusieurs types cellulaires tels que les neurones, les astrocytes ou encore la microglie. Dans ce chapitre, nous résumerons les différents effets biologiques engendrés par l'ApoE et son implication dans la pathologie.

1.5.1 Structure de l'ApoE

L'ApoE est une glycoprotéine de 299 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 34KDa et son gène est situé sur le chromosome 19 (Figure 15A).

Le foie est le tissu majeur de synthèse de l'ApoE (75% de la production d'ApoE total), suivi par le cerveau (Elshourbagy et al. 1985). Dans le cerveau, les astrocytes, la microglie, les cellules musculaires lisses vasculaires et des plexus choroïdes expriment de façon constitutive l'ApoE alors que les neurones l'expriment sous des conditions de stress (Q. Xu 2006).

L'ApoE possède deux régions fonctionnelles majeures : la région permettant la liaison aux récepteurs (résidus 136-150) située au niveau du domaine N-terminal et la région permettant la liaison aux lipides (résidus 244-272) située au niveau C-terminal de la protéine (Figure 15B). L'ApoE existe sous plusieurs isoformes : E2, E3, E4. Cette hétérogénéité des isoformes est due aux polymorphismes génétiques (Zannis and Breslow 1981).

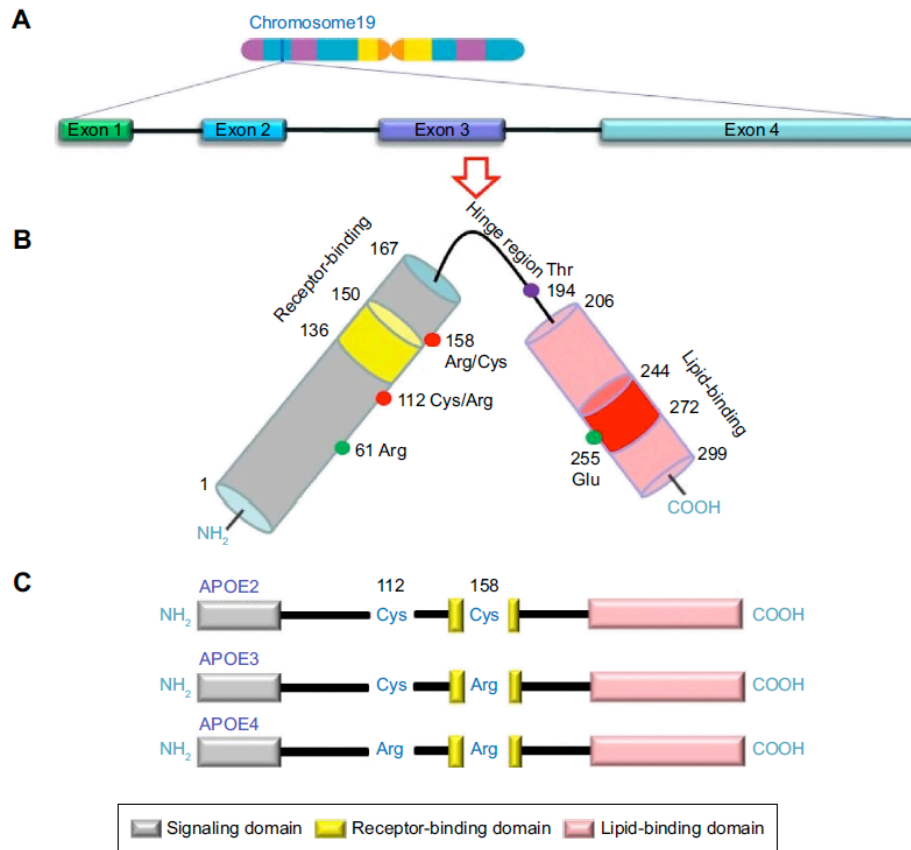


Figure 15 : Représentation schématique de la structure de l'ApoE.

A : Localisation et structure du gène de l'ApoE situé sur le chromosome 19. **B** : Le domaine N-terminal contenant un site de liaison aux récepteurs (résidus 136-150), et le domaine C-terminal contenant un site de liaison aux lipides (résidus 244-272) sont représentés en jaune et rouge respectivement. **C** : Les isoformes ApoE2, E3 et E4 exprimées par les allèles ϵ_2 , ϵ_3 et ϵ_4 respectivement du gène de l'ApoE ne diffèrent que par la substitution d'un seul acide aminé (cercles rouges) à la position 112 ou 158 (Giau et al. 2015).

Les apolipoprotéines E2 et E3 ont une affinité préférentielle pour les lipoprotéines de haute densité (HDL ; de l'anglais « High Density Lipoprotein ») alors que les apolipoprotéines E4 sont associées aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL ; de l'anglais « Very Low Density Lipoprotein ») (Dong et al. 1994). Les principaux récepteurs interagissant avec l'ApoE sont les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs aux LDL (LDLR) tels que LDLR (Innerarity and Mahley 1978) et LRP1 (Beisiegel et al. 1989; Kowal et al. 1989) ; les récepteurs des VDL (VDLR) et les apolipoprotéines E récepteur 2 ApoER2 (D. H. Kim et al. 1996). En plus des récepteurs de la famille des LDLR, l'ApoE est capable de se lier aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Ji et al. 1993), sous sa forme non lipidée ou lipidée au niveau de deux régions : le domaine N-terminal entre les résidus 136-150, et le domaine C-terminal par la Lysine 233 (H. Saito et al. 2003; Futamura et al. 2005). Les récepteurs LRP1 peuvent former un complexe avec les HSPG : soit l'ApoE se lie dans un

premier temps aux HSPG puis est transférée aux LRP1 pour être internalisée, soit l'ApoE peut se lier directement par les complexes LRP1-HSPG (Ji et al. 1993). L'ApoE se lie aux récepteurs avec une affinité différente selon l'isoforme. En effet, les apolipoprotéines ApoE3 et ApoE4 se lient aux récepteurs LDLR avec une affinité similaire. En revanche, l'ApoE2 présente une affinité plus faible pour ces récepteurs (W. J. Schneider et al. 1981).

1.5.2 L'ApoE et les lipides

Les transporteurs lipidiques ABCA1 (de l'anglais « ATP-binding cassette 1 ») et les membres de cette famille tels que l'ABCG1 (de l'anglais ATP-binding cassette sub-family G member 1) sont des protéines clés pour la lipodation. L'ApoE est dans un premier temps partiellement lipodée par ABCA1, puis par ABCG1 dans un second temps (Hirsch-Reinshagen et al. 2004; S. E. Wahrle et al. 2004).

Le transport du cholestérol médié par ApoE4 est moins efficace que celui médié par l'ApoE3, cette dernière étant moins lipodée que l'ApoE4 (Michikawa et al. 2000; Fu et al. 2016). Mais les effets pathologiques de l'ApoE4 peuvent être inversés par un régime lipidique approprié à l'acide docosahexaénoïque DHA (Kariv-Inbal et al. 2012). En effet, les patients atteints de la MA présentent des taux plus faibles de DHA dans le plasma par rapport à des contrôles. Cependant, les mécanismes impliquant cet effet neuroprotecteur du DHA sont encore mal compris (Florent-Bécharde et al. 2007). Ces données suggèrent que les effets pathologiques engendrés par l'ApoE4 pourraient être contrés en augmentant sa lipodation

1.5.3 L'ApoE et la clairance de l'Aβ

Les différentes isoformes d'ApoE (E2, E3 et E4) jouent un rôle différent en neurobiologie, avec cependant une différence entre ces isoformes qui ne réside que sur la substitution d'un seul acide aminé. Les patients atteints de la MA avec un génotype ApoE4 présentent de très forts taux d'Aβ et une importante densité de plaques amyloïdes dans le cerveau (Schmechel et al. 1993; William Rebeck et al. 1993; Tiraboschi et al. 2004).

Les effets de l'ApoE sur l'homéostasie de l'Aβ sont très complexes. Ces effets pourraient mettre en jeu des interactions directes ou indirectes de l'ApoE avec l'Aβ dépendants de la lipodation de l'ApoE ou encore des isoformes. De ce fait, des études se sont intéressées aux différences d'affinité pour l'Aβ qui pourraient exister entre les différentes isoformes.

L'ApoE3 a une meilleure affinité pour l'A β 40 et 42 par rapport à l'ApoE4 et une délipidation des apolipoprotéines abolit totalement cet effet isoforme dépendant (Tokuda et al. 2000).

L'ApoE affecte l'accumulation de l'A β en modulant son agrégation (J. Ma et al. 1994; Wisniewski et al. 1994) et sa clairance par trois voies prédominantes (Sadowski et al. 2006; Deane et al. 2008; Jiang et al. 2008; Castellano et al. 2011):

- la dégradation de l'A β par les astrocytes et les cellules microgliales
- la dégradation protéolytique de l'A β
- l'efflux de l'A β à travers la BHE

Des études ont montré que l'ApoE favorise l'internalisation et par conséquent la dégradation de l'A β de manière isoforme dépendante dans des cultures de cellules de neuroblastomes et des cultures primaires d'astrocytes (Yamauchi et al. 2002; Koistinaho et al. 2004). Des expériences *in vivo* ont mis en évidence une clairance plus lente de l'A β chez les souris transgéniques ApoE4 Knock-In (exprimant l'ApoE humain) par rapport aux souris transgéniques ApoE3, avec une charge amyloïde présente dans l'hippocampe 2 à 4,6 fois plus importante chez les souris ApoE4 (Castellano et al. 2011). Ces différences de clairance isoformes-dépendantes sont présentes non seulement chez des souris âgées (20 à 21 mois) mais également chez de jeunes souris entre 3 et 4 mois. Cependant, les voies contribuant à la clairance de l'A β restent complexes et difficiles à expliquer (Ronald B. DeMattos et al. 2004). La deuxième voie de dégradation de l'A β met en jeu des protéases telles que les néprylisines NEP ou encore les enzymes de dégradation de l'insuline IDE (de l'anglais « Insulin-Degrading Enzyme »). Une perte de fonction des NEP ou un traitement avec un inhibiteur des NEP conduit à une augmentation des taux d'A β dans le cerveau (Farris et al. 2007; Iwata et al. 2000; Farris et al. 2003). À l'inverse, la surexpression des NEP ou IDE diminue les taux d'A β d'environ 90% (Leissring et al. 2003). Les neurones sont eux aussi capables d'éliminer l'A β par la dégradation via la voie lysosomale (Mandrekar et al. 2009) et cette dégradation est plus efficace pour les cellules N2a pré-incubées avec l'ApoE3 que pour les cellules pré-incubées avec l'ApoE4 (J. Li et al. 2012).

Mais l'ApoE peut interagir directement avec les récepteurs LRP1 et par conséquent entrer en compétition avec l'A β (Verghese et al. 2013). Ainsi, plusieurs études décrivent l'ApoE comme étant inhibiteur de la clairance de l'A β dans des cultures primaires microgliales et d'astrocytes humains (Mulder et al. 2014; Verghese et al. 2013; Nielsen et al. 2010). De ce fait, des études ont donc ciblé l'ApoE par des immunothérapies basées sur l'injection

anticorps anti-ApoE. Ces immunothérapies réduisent considérablement les charges amyloïdes présentes dans les cerveaux de souris transgéniques APP/PS1 (Liao et al. 2014; J. Kim et al. 2012).

Les récepteurs appartenant à la famille des LDLR sont très fortement impliqués dans la clairance de l'A β à travers la BHE. En effet, les LDLR sont caractérisés comme étant des récepteurs majeurs aux ApoE dans le SNC régulant le dépôt de peptides amyloïdes dans plusieurs modèles de souris transgéniques (J. Kim et al. 2009; Basak et al. 2012). La surexpression des LDLR permet de diminuer les taux d'ApoE dans le cerveau de souris transgéniques et d'améliorer la clairance de l'A β dans le plasma (J. Kim et al. 2009; Castellano et al. 2012).

Ainsi, toutes ces études montrent très clairement que l'ApoE joue un rôle crucial dans la clairance de l'A β et que l'isoforme ApoE4 conduit à un défaut de clairance. Ce défaut de clairance engendre une accumulation amyloïde néfaste et peut conduire à l'agrégation des peptides A β et à une neurotoxicité.

1.5.4 L'ApoE, l'agrégation de l'A β et la neurotoxicité

Plusieurs études ont analysé les effets de l'ApoE sur l'agrégation de l'A β *in vitro*, cependant le sujet reste encore controversé. Il a été décrit que l'ApoE4 est plus favorable à l'agrégation de l'A β par rapport à l'ApoE3 (J. Ma et al. 1994; Castano et al. 1995; M. K. Kang et al. 2015). L'ApoE augmente les taux d'oligomères A β de manière isoforme dépendante avec un effet plus important pour l'isoforme ApoE4 (T. Hashimoto et al. 2012; Garai et al. 2014) dans les cerveaux de patients atteints de la MA. Cependant, d'autres études montrent que l'ApoE diminue la fibrillogénèse. En effet, l'ApoE inhibe très fortement la nucléation et l'initiation de la formation de fibrilles d'A β et ce même après ajout d'ensemencements d'agrégats d'A β (Evans et al. 1995; Wood, Chan, and Wetzel 1996a; Wood, Chan, and Wetzel 1996b; Naiki, Gejyo, and Nakakuki 1997). *In vivo*, les complexes solubles A β /ApoE sont présents en plus faible quantité chez les souris transgéniques 5xFAD-ApoE4 (exprimant cinq mutations familiales de la MA et l'ApoE4) que chez les souris 5xFAD-ApoE3 ou E4 (Tai et al. 2013) et les taux d'oligomères d'A β sont plus élevés dans le LCR de patients ApoE4.

Les Apolipoprotéines ApoE3 et E4 présentent des différences de clivage protéolytique pouvant avoir des effets nocifs pour la survie neuronale. Plusieurs études ont montré dans des cultures neuronales transfectées et dans des souris transgéniques exprimant l'ApoE3 ou l'ApoE4 spécifiquement dans les neurones, que l'ApoE4 est plus susceptible de subir un clivage protéolytique par rapport à l'ApoE3 (Brecht et al. 2004; Harris et al. 2003). Ces fragments protéolytiques, appelés ApoE4 Δ 272-299, sont présents en grande quantité dans les plaques amyloïdes des patients atteints de la MA par rapport aux contrôles et les DNF, avec un effet gène ApoE4 dose-dépendant (Y Huang et al. 2001; Harris et al. 2003; Jones et al. 2011).

En plus d'engendrer un clivage protéolytique toxique pour les cellules, l'ApoE4 perturbe le cytosquelette et nuit aux fonctions mitochondriales de la cellule induisant une neurotoxicité (Tesseur et al. 2000). Une des cibles des fragments neurotoxiques sont les composants du cytosquelette tels que la protéine tau et les neurofilaments (Y Huang et al. 2001; Ljungberg et al. 2002; G. Li et al. 2009; Andrews-Zwilling et al. 2010). *In vivo*, l'ApoE4 protège autant que l'ApoE3 de l'excitotoxicité mais l'expression neuronale de l'ApoE4 n'est pas protectrice et conduit à la perte des neurones corticaux après un stress excitotoxique (Buttini et al. 2010). De plus, les souris ApoE4 knock In présentent des déficits de développement des épines dendritiques dans l'hippocampe (Jain et al. 2013). Enfin, la dégénérescence dans le cerveau des souris est médiée par l'action de l'ApoE4 et des oligomères (Manelli et al. 2007; Belinson et al. 2010).

L'ApoE4 conduit donc à l'accumulation d'A β de façon isoforme dépendante et favorise l'agrégation des peptides A β . Cette cascade d'évènements peut conduire à une neurotoxicité de l'ApoE4. Ainsi, toutes ces informations révèlent le caractère néfaste de l'expression de l'ApoE4 dans les neurones, résumé sur le schéma ci-dessous (Figure 16).

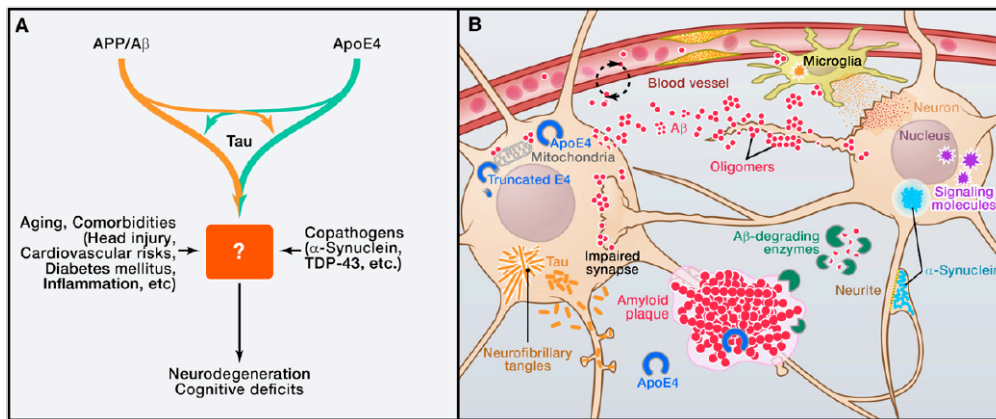


Figure 16 : Les effets multifactoriels de la pathologie de la MA médiés par l'ApoE.

A : Plusieurs facteurs participent au développement de la MA tels que l'APP, l'Aβ, tau le vieillissement et l'ApoE4. Les mécanismes conduisant à la pathologie restent à déterminer. **B** : L'agrégation et l'accumulation de l'Aβ peuvent résulter d'une production accrue d'Aβ, d'une diminution de la dégradation par les enzymes dégradants l'Aβ (NEP et IDE) ou d'une clairance réduite à travers la BHE. Les oligomères d'Aβ altèrent les fonctions synaptiques et les voies de signalisation associées en modulant l'activité neuronale et en déclenchant la libération de médiateurs neurotoxiques des cellules gliales. L'ApoE4 réduit la clairance et favorise le dépôt d'Aβ. L'ApoE4, exprimé dans des conditions de stress dans les neurones, est clivé en plus grande proportion que l'ApoE3 en fragments neurotoxiques, perturbant ainsi le cytosquelette et les fonctions mitochondriales (Yadong Huang and Mucke 2012).

1.6 Le métabolisme du cholestérol et la MA

Tout au long cette introduction, nous avons vu que le cholestérol est impliqué dans le développement de la MA. En effet, certaines études ont montré que chez des patients atteints de la MA, la concentration en cholestérol cérébral est anormalement élevée. Mais d'où vient ce cholestérol ?

1.6.1 Le métabolisme du cholestérol cérébral

Le cholestérol joue un rôle crucial dans le développement et la plasticité neuronale. L'apport de cholestérol favorise la croissance des neurones (Hayashi et al. 2004) et le développement du réseau synaptique (Mauch 2001). Le cerveau, organe le plus riche en cholestérol du corps, représente seulement 2 à 5% du poids du corps mais stocke à lui seul 25% du cholestérol total (J.M. Dietschy and Turley 2001).

La majorité du cholestérol cérébral dans le SNC se trouve dans la myéline (70 à 90%) qui entoure les axones et facilite la transmission du signal électrique. La myéline est constituée de 70% de lipides et 30% de protéines (John M Dietschy and Turley 2004). Le cholestérol est un facteur limitant essentiel pour la croissance des membranes de myéline et par conséquent la maturation du SNC (Saher et al. 2005). La synthèse de cholestérol est donc très conséquente

dans les oligodendrocytes durant la phase de maturation du cerveau. Cependant, la synthèse se poursuit à de plus faibles taux dans le cerveau mature (cerveau adulte), particulièrement dans les astrocytes où le taux de biosynthèse de cholestérol est deux à trois fois plus élevé que dans les neurones (Björkhem, Meaney, and Fogelman 2004; M. Saito et al. 1987; Nieweg, Schaller, and Pfrieger 2009). Néanmoins, les oligodendrocytes, seraient capables de synthétiser davantage de cholestérol que les astrocytes (Koper et al. 1984).

Le renouvellement du cholestérol du cerveau est de l'ordre d'une demi-année dans le cerveau de rat (Sérougne-Gautheron and Chevallier 1973; Canevari and Clark 2007) et 5 ans chez l'humain (Björkhem et al. 1998).

1.6.1.1 Synthèse in situ du cholestérol cérébral

Il n'y a pas d'échange entre le cholestérol périphérique et le cholestérol du cerveau car le cholestérol libre ne peut pas franchir la BHE. La quasi-totalité du cholestérol dans le cerveau est synthétisé in situ (J.M. Dietschy and Turley 2001). Cette compartimentation du métabolisme du cholestérol dans le corps explique pourquoi l'homéostasie du cholestérol dans le SNC est régulée indépendamment de celle de la circulation périphérique. Cependant des formes hydroxylées en 24 par l'enzyme strictement neuronale 24-hydroxylase (CYP46A1) peuvent traverser la BHE. Ainsi, cette modification permet l'efflux d'un excès de cholestérol cérébral vers le sang, qui l'acheminera au foie, où il pourra être dégradé. À l'inverse, la forme 27-hydroxy-cholestérol permet l'entrée du cholestérol sanguin dans le cerveau. Dans le cerveau adulte, la majorité du cholestérol libre est synthétisé ou internalisé par les astrocytes. Il est alors pris en charge par un transporteur, l'apolipoprotéine E (ApoE) pour être délivré aux neurones. Ce transport est facilité par une protéine membranaire l'ABCA1 (ATP-binding cassette transporter 1) qui facilite également la complexation du cholestérol avec l'ApoE et les phospholipides. Les neurones captent ces complexes via les récepteurs LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein). Le cholestérol libre sera alors soit stocké sous forme d'ester de cholestérol soit utilisé pour les différentes fonctions physiologiques du neurone. Il sera en particulier enrichi dans des microdomaines de la membrane plasmique, appelés radeaux lipidiques ou lipid rafts (Figure 17).

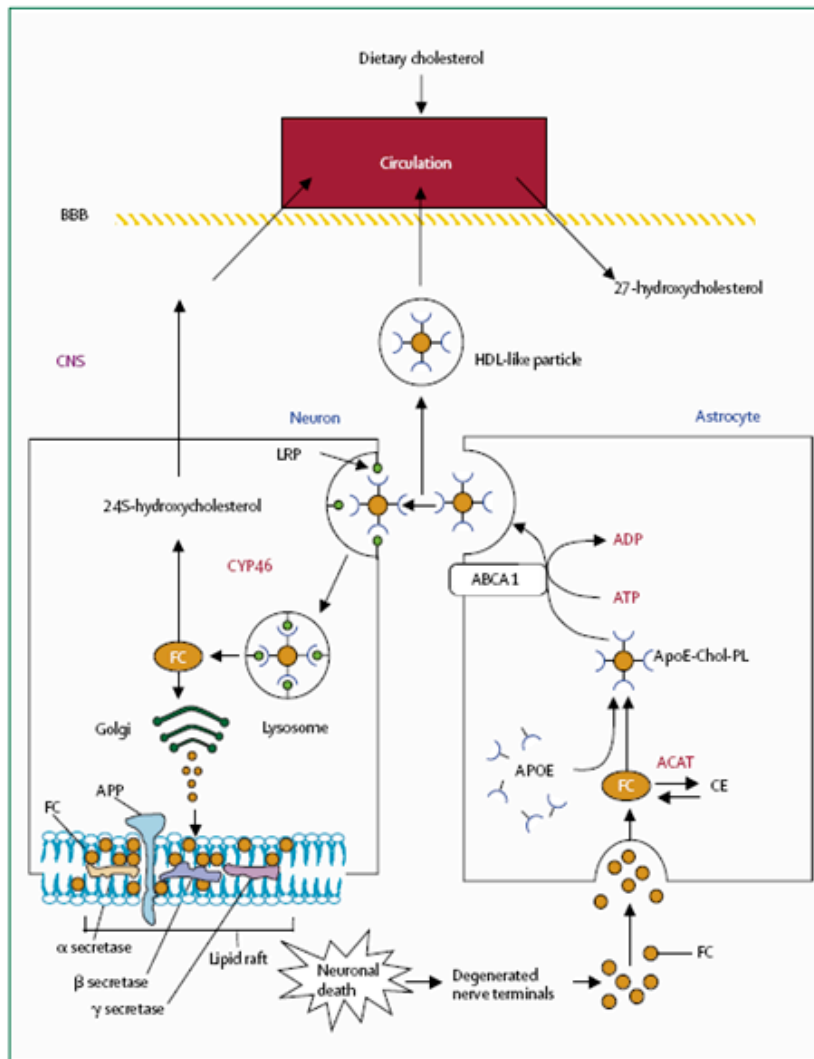


Figure 17 : Métabolisme du cholestérol intracérébral.

Le cholestérol et l'ApoE sont synthétisés dans les astrocytes. ABCA1 permet la formation du complexe APOE-cholestérol pour leur sécrétion dans le milieu extracellulaire sous forme de lipoprotéines, puis sont captés par les neurones via les récepteurs aux LDL (récepteurs LRP1 sur ce schéma). Les neurones peuvent ensuite utiliser le cholestérol pour enrichir les radeaux lipidiques de la membrane plasmique par exemple. La β et γ -sécrétase sont localisés dans les radeaux lipidiques. L'excès de cholestérol est transformé en 24-hydroxycholestérol par CYP46A1, puis ce dernier passe la BHE (Shobab, Hsiung, and Feldman 2005)

FC : cholestérol libre, CE : ester de cholestérol, BBB : barrière hémato-encéphalique, ABCA1 : ATP-binding cassette transporter 1, APOE : apolipoprotéine E, ACAT : Acylcoenzyme A cholestérol acyltransferase, Chol : cholestérol, PL : phospholipide.

1.6.1.2 Etapes de synthèse du cholestérol

Les précurseurs de la synthèse de cholestérol sont deux molécules d'acetyl-coA qui vont être converties en 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (appelée HMG-CoA). L'HMGCoA est ensuite à son tour convertie en mévalonate par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGCR) dans le réticulum endoplasmique.

Le mévalonate subit ensuite plusieurs réactions de phosphorylation pour aboutir à la formation d'isopentyl-5-phosphate, puis à la formation du squalène. Après plusieurs réactions enzymatiques, le squalène est converti en lanostérol puis en cholestérol (par deux voies enzymatiques : la voie Bloch et la voie Kandutsch-Russell. Ces deux voies donnent naissance à des intermédiaires de synthèse différents mais par l'implication des mêmes enzymes (Figure 18).

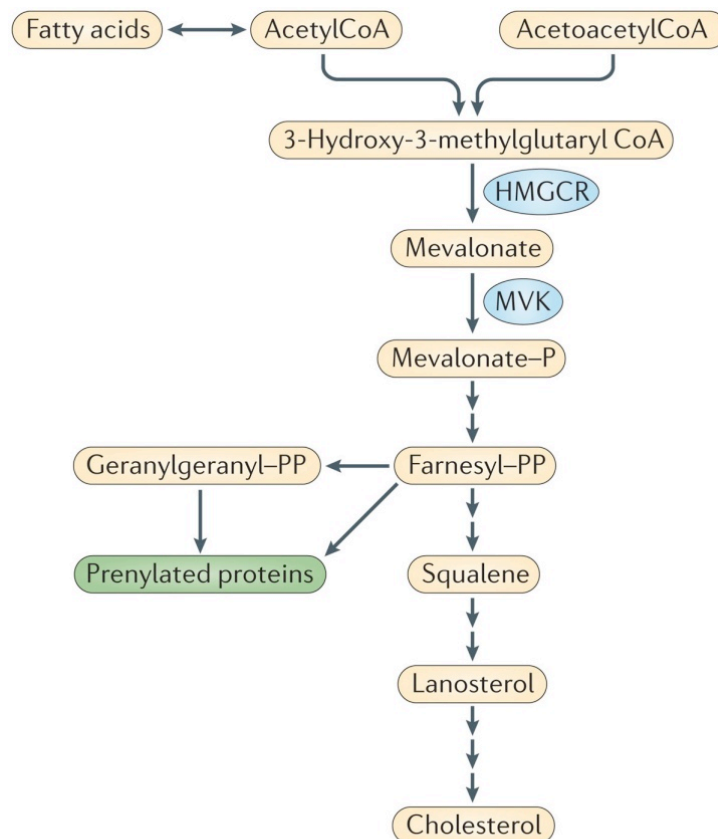


Figure 18 : Voie de synthèse du cholestérol (Cyster et al. 2014).

L'activité de l'HMGCR est contrôlée par deux mécanismes bien distincts. Une augmentation de cholestérol membranaire conduit à une inhibition de la synthèse par l'activation de l'ubiquitination de l'HMGCR et par conséquent sa dégradation. Le second mécanisme implique les éléments de régulation des stérols (SREBP), qui sont des facteurs de transcription liés à la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 20)(M. S. Brown and Goldstein 2009). En réponse à de faibles concentrations en stérols, ces facteurs de transcription sont activés : le complexe SCAP/SREBP (de l'anglais « SREBP Cleavage-Activating Enzyme/Sterol Regulatory Element-Binding Proteins ») quitte le réticulum endoplasmique pour être transporté au Golgi. Par la suite, SREBP est clivé par deux protéases

nommées S1P et S2P, ce qui permet au fragment N-terminal de SREBP d'entrer dans le noyau pour activer des gènes de la voie de biosynthèse lipidique, dont la HMGCR (Figure 19).

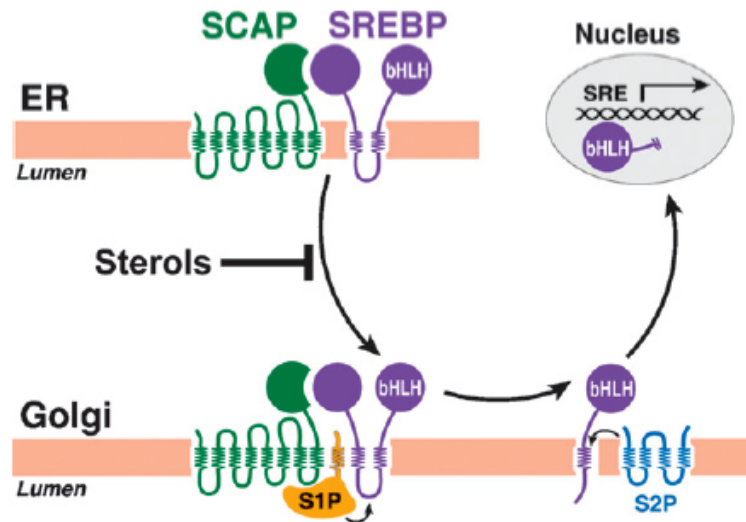


Figure 19 : Le contrôle de la biosynthèse lipidique par la voie SREBP. Dans le cas d'une déplétion en stérols ou de faible taux de cholestérol, le transporteur SCAP transporte SREBP du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. S1P et S2P clivent SREBP dans l'appareil de Golgi (site de clivage indiqué par une flèche). Le domaine bHLH-Zip (basic Helix-Loop-Helix+leucine-zipper) N-terminal de SREBP quitte la membrane de l'appareil de Golgi et entre dans le noyau pour l'activation de gènes contrôlant la synthèse des lipides (M. S. Brown and Goldstein 2009).

Comme nous l'avons évoqué, le cholestérol est synthétisé par les astrocytes puis utilisé par les neurones. Le cholestérol a donc besoin de systèmes de transport pour être délivré aux neurones.

1.6.1.3 Le transport du cholestérol dans le cerveau

Le cerveau contient différentes apolipoprotéines participant au transport du cholestérol : l'apolipoprotéine E (ApoE), l'apolipoprotéine J ou clusterine (ApoJ/CLU) et l'apolipoprotéine D (ApoD) (Pfrieger and Ungerer 2011). L'ApoE est retrouvée sous forme majoritaire dans le cerveau (Vitali, Wellington, and Calabresi 2014) et est produite de façon majoritaire par les astrocytes en condition physiologique (Boyles et al. 1985; C. T. Lin et al. 1986; Qin Xu et al. 2006). Mais les neurones d'hippocampe peuvent exprimer l'ApoE en condition de stress après une lésion excitotoxique (P. T. Xu et al. 1999; Q. Xu 2006). L'ApoE joue un rôle essentiel dans le développement du cerveau et dans les souris knock-out pour l'ApoE il est observé une perte de l'intégrité synaptique et dendritique ainsi que des déficits

cognitifs (Anderson et al. 1998; Krugers et al. 1997; Oitzl et al. 1997). Lorsque les lésions sont présentes dans le SNC, les cellules gliales synthétisent 150 fois plus d'ApoE (Ignatius et al. 1986; Snipes et al. 1986) (Ignatius et al. 1986; Snipes et al. 1986; Boyles et al. 1990).

Les Apolipoprotéines ApoD et ApoJ sont également exprimées dans les astrocytes et dans certains neurones (Smith, Lawn, and Wilcox 1990; Pasinetti et al. 1994; Y et al. 2000). L'ApoD joue un rôle compensatoire dans le cerveau de souris ApoE déficientes (Jansen et al. 2009; Terrisse et al. 1999). Son affinité pour le cholestérol est faible par rapport aux autres lipoprotéines (Y et al. 2000).

L'ApoJ est up-régulée dans plusieurs perturbations physiologiques sévères telles que la formation et la progression de cancers, la neurodégénération et l'inflammation (Trouwakos and Gonos 2002).

Plusieurs études portant sur les lipoprotéines produites par les astrocytes *in vitro*, montrent qu'elles possèdent des propriétés physico-chimiques différentes de celles retrouvées dans le plasma (A M Fagan et al. 1999; R B DeMattos et al. 2001). Ces lipoprotéines contiennent des phospholipides et du cholestérol mais comparativement peu de cholestérol estérifié ou de triglycérides. Certains précurseurs du cholestérol, tels que le lathostérol et le desmostérol, sont retrouvés dans les lipoprotéines provenant d'astrocytes suggérant une sécrétion des précurseurs par les astrocytes, absorbés dans un premier temps par les neurones puis convertis en cholestérol (Mutka et al. 2004; N. Wang et al. 2008).

Les composants essentiels du transport des lipides dans le cerveau sont les transporteurs ABC (de l'anglais « ATP Binding Cassette »). ABCA et ABCG sont les classes majeures retrouvées dans le cerveau et jouent un rôle important dans l'homéostasie des lipides (Prasad, Khandelwal, and Banerjee 2016; Schmitz, Kaminski, and Orsó 2000). Le transporteur ABCA1 permet de transférer le cholestérol cellulaire à des accepteurs tels qu'ApoA1, puis ABCG1 prend en charge la lipidation des HDL. L'apolipoprotéine A1 (ApoA1) n'est pas synthétisée par les astrocytes ou les neurones mais par d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et les cellules des plexus choroïdes (Weiler-Güttler et al. 1990; Möckel et al. 1994). L'association aux lipides est requise pour la stabilité de l'ApoE dans le cerveau. La quantité d'ApoE contenue dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le cerveau, ainsi que sa lipidation sont régulés par les transporteurs ABCA1 (S. E. Wahrle et al. 2004; Hirsch-Reinshagen et al. 2005). Wahrle et al., montrent que les souris ABCA1 déficientes présentent de fortes réductions de taux d'ApoE dans le cerveau et dans le

LCR (80% et 98% respectivement). Ces souris montrent une lipodation anormale de l'ApoE dans les astrocytes avec de très faibles taux de cholestérol associés aux ApoE. En revanche, une surexpression de ABCA1 augmente la taille des lipoprotéines contenues dans le LCR, et le ratio de cholestérol/ApoE dans le surnageant de cultures d'astrocytes (S. E. Wahrle et al. 2004). Toutes ces données indiquent une compensation du manque de lipodation par l'augmentation de la synthèse d'ApoE. Inversement, les transporteurs ABC compensent la diminution de l'efflux de cholestérol. En effet, les souris déficientes en ApoE compensent cette perte en stimulant l'expression d'ABCA1 (Jansen et al. 2009). De plus, la lipodation de l'ApoE par ABCA1 varie selon les régions : la perte d'expression d'ABCA1 diminue les taux d'ApoE de manière plus importante dans l'hippocampe et le striatum (Hirsch-Reinshagen et al. 2004).

Les transporteurs ABCA7, ABCG1 et ABCG4 exportent le cholestérol cellulaire et sont fortement exprimés dans le cerveau (Oldfield et al. 2002; Ito 2003; Nakamura et al. 2004; N. Wang et al. 2004). Le transporteur ABCA7, considéré comme un facteur de risque de la MA (figure 17), peut jouer le rôle de compensateur. C'est un homologue proche d'ABCA1 (Kaminski et al. 2000; N. Wang et al. 2003; Abe-Dohmae et al. 2004). Une étude met en évidence la colocalisation d'ABCG1 et ABCG4 dans les endosomes d'astrocytes (Tarr and Edwards 2008). Dans cette étude, la surexpression de ces deux transporteurs dans des cultures primaires d'astrocytes de souris augmente l'expression de SREBP-2 et par conséquent la synthèse de cholestérol. La surexpression d'ABCG1 diminue significativement les taux de précurseurs du cholestérol : le lathostérol, lanostérol et desmostérol (Burgess et al. 2008). Ce qui suggère une influence directe ou indirecte des transporteurs ABC sur la synthèse de cholestérol ou l'efflux des précurseurs du cholestérol.

1.6.1.4 Elimination du cholestérol

Pour empêcher l'accumulation de cholestérol dans la cellule, le cholestérol est converti en ester de cholestérol par l'acétyl-CoA acétyltransférase (ACAT) sous forme de gouttelettes lipidiques cytosoliques (Chang et al. 2009). Ce processus prend place au niveau du réticulum endoplasmique. Le cholestérol intracellulaire étant majoritairement sous forme non-estérifiée, il est donc par conséquent majoritairement éliminé et pris en charge par l'ACAT. Un traitement avec un inhibiteur de l'ACAT sur des souris transgéniques exprimant les mutations Swedish et London, diminue la concentration en cholestérol esterifié dans le cerveau

d'environ 86% (Hutter-paier et al. 2004) et diminue la sécrétion d'A β . Une étude intéressante d'association génétique met en évidence que le polymorphisme du gène codant pour l'ACAT est associé à une faible charge amyloïde dans le cerveau et à de faibles taux de cholestérol retrouvés dans le LCR (Wollmer et al. 2003). ABCA1 est capable d'éliminer une partie du cholestérol en excès. Une étude montre que l'efflux de cholestérol diminue dans des cultures neuronales, par l'utilisation d'ARN interférents permettant la diminution de l'expression d'ABCA1 (Minagawa et al. 2009).

La conversion en oxystérol est la voie d'excrétion majeure dans le cerveau. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hydroxylation du cholestérol en 24-hydroxycholestérol (24-OHC) est catalysée par la 24S-hydroxylase CYP46A1 (David W. Russell, Rebekkah W. Halford, Denise M.O. Ramirez 2008). Contrairement au cholestérol non-oxydé, le 24-OHC peut traverser les membranes telle que la BHE plus rapidement (Lange, Ye, and Strebel 1995; Meaney et al. 2002). CYP46A1 est une protéine membranaire d'environ 500 acides aminés, ancrée dans le réticulum endoplasmique via son domaine N-terminal transmembranaire (Mast et al. 2009) et fait partie de la famille des cytochromes P450 (E.G. Lund, Guileyardo, and Russell 1999). Cette enzyme est exprimée principalement dans la substance grise du SNC. CYP46A1 est très fortement exprimée dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe et du cortex, dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans les interneurons de l'hippocampe et du cervelet. CYP46A1 est retrouvée dans le soma et les dendrites des neurones, mais pas dans l'axone (Lionel Bretilon et al. 2007; David W. Russell, Rebekkah W. Halford, Denise M.O. Ramirez 2008; Nieweg, Schaller, and Pfrieder 2009). CYP46A1 est une enzyme importante pour l'efflux du cholestérol cérébral. En effet, des souris déficientes en CYP46A1 présentent une réduction de deux tiers de l'efflux du cholestérol (Erik G. Lund et al. 2003).

1.6.1.5 Les radeaux lipidiques

Le cholestérol est enrichi dans des microdomaines de la membrane plasmique de petite taille (10- 200nm), appelés radeaux lipidiques ou lipid rafts (Colin, Gregory-Pauron, et al. 2016). Les radeaux lipidiques sont résistants aux détergents. Ainsi, en se basant sur cette propriété les techniques biochimiques employant l'utilisation des détergents à basse température, permettent l'extraction et l'étude de ces radeaux lipidiques (D. A. Brown and London 1998). Ce sont des plateformes de signalisation essentielles à la transmission de signaux intracellulaires qui sont associés au cytosquelette (K Simons and Toomre 2000; Kai Simons

and Gerl 2010). Les protéines telles que les flotillines ou les caveolines participent à la stabilité de ces microdomaines (Hanzal-Bayer and Hancock 2007).

Le lien entre les radeaux lipidiques et le processing de l'APP a fait l'objet de plusieurs études. En effet, l'APP est localisée dans les radeaux lipidiques de même que la β -sécrétase et la γ -sécrétase (Vetrivel et al. 2004; Hattori et al. 2006) (Figure 20). La palmitoylation de l'APP régule son clivage dans les radeaux lipidiques, qui intervient de façon très importante chez les souris âgées (Bhattacharyya, Barren, and Kovacs 2013). La concentration en cholestérol membranaire influence également le clivage de l'APP. De plus, le cholestérol module la localisation de l'APP et de ses sécrétases (M. Simons et al. 1998). Ainsi, une augmentation de cholestérol membranaire entraîne une augmentation de la proximité de l'APP et de BACE1 dans les radeaux lipidiques (Marquer et al. 2011), conduisant à une augmentation du clivage de l'APP et par conséquent de la sécrétion de peptides amyloïdes (Sakurai et al. 2008; J. C. Cossec et al. 2010; Marquer et al. 2014).

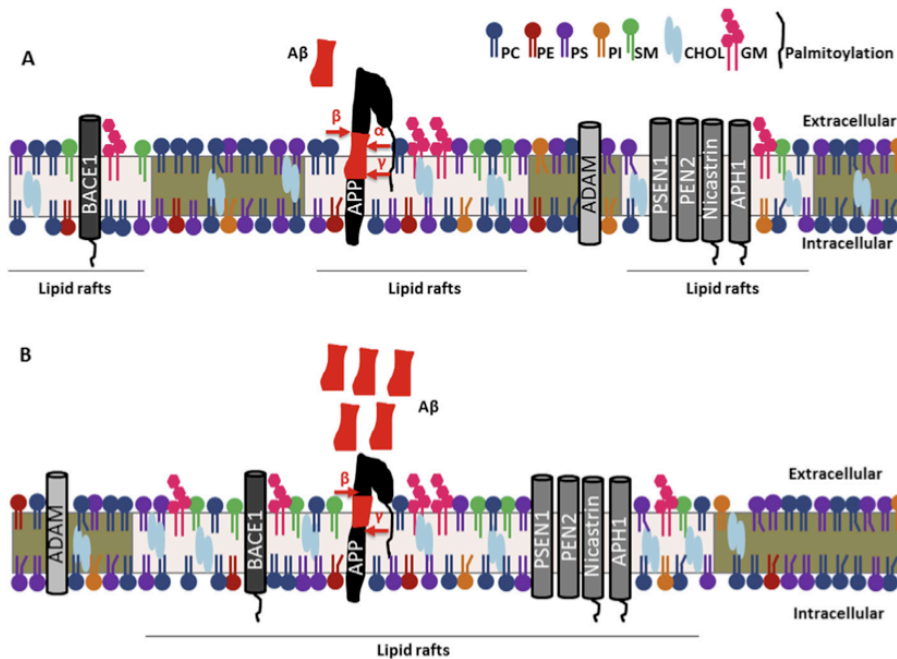


Figure 20 : Représentation schématique du rôle des radeaux lipidiques dans le clivage de l'APP.

A : En condition physiologique, les composants de la membrane tels que BACE1 (β -sécrétase) et l'ADAM (α -sécrétase) sont positionnés dans des radeaux lipidiques (correspondants aux zones éclaircies) différents ce qui limite leur interaction avec l'APP (en noir). **B** : Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les radeaux lipidiques subissent des changements dans leur composition lipidique avec notamment une augmentation du cholestérol (en bleu clair), et colocalisent avec les composants dans un même radeau ce qui induit une augmentation de la sécrétion d'A β (en rouge). L' α -sécrétase n'est pas associée aux radeaux lipidiques alors que la γ -sécrétase y prédomine. La palmytoilation de BACE1 et de la γ -sécrétase (au niveau des sous-unités nicastrine et APh1) conduit au rapprochement de ces protéines dans les radeaux lipidiques. La palmytoilation de l'APP favorise également son recrutement au sein des radeaux lipidiques, ce qui engendre une augmentation de son clivage par BACE1 (Colin, Gregory-Pauron, et al. 2016).

1.7 Le cholestérol et la maladie d'Alzheimer

1.7.1 Le cholestérol chez les patients atteints de la MA

Nous avons pu voir que le cholestérol cérébral ne traverse pas la BHE. Cependant l'intégrité de la BHE est perturbée dans la MA (Erickson and Banks 2013) ce qui pourrait altérer l'homéostasie du cholestérol cérébral dans la maladie. Il est donc logique que de nombreuses études se soient intéressées au cholestérol dans la MA, et aient tenté d'établir un lien entre les taux de cholestérol cérébral ou plasmatique avec la pathologie. Nous pouvons émettre l'hypothèse que si de hauts taux de cholestérol sont retrouvés dans le plasma ou le sérum de patients atteints de la MA, le cholestérol pourrait alors être un facteur de développement de la maladie et constituerait un biomarqueur idéal. Il en découlerait donc que les patients présenteraient de forts taux de cholestérol cérébral et qu'un dysfonctionnement de la BHE expliquerait le passage du cholestérol dans la circulation périphérique de façon abondante. Un autre argument en faveur du cholestérol comme biomarqueur potentiel dans la maladie, est que l'administration d'un régime hypercholestérolémié chez des lapins conduit à la présence de plaques amyloïdes et donc à la pathologie de la MA (Sparks et al. 1994). Cependant, à l'heure actuelle il est difficile de conclure sur une réelle corrélation entre le cholestérol retrouvé dans le plasma ou le sérum et la MA, au vu des conclusions contradictoires retrouvées dans la littérature que nous évoquerons dans ce chapitre.

1.7.1.1 Dans le sérum et le plasma

En 1995, Jarvik et al. expliquent que le génotype ApoE et la MA sont dépendants du taux total de cholestérol, de l'âge et du sexe (Jarvik et al. 1995). Des études montrent qu'il n'existe aucune différence entre les taux de cholestérol retrouvés dans le sérum de patients et ceux des contrôles et que le cholestérol total présent dans le sérum n'est pas associé au risque de développer la maladie (Kuo et al. 1998; Tan et al. 2003). Tan et al, ont effectué ces analyses sur une grande population de 77 sujets (sur 5209 participants au début de l'étude) qui ont développés la maladie entre les années 1992 et 2000, au cours de 15 cycles d'examen. Une autre étude montre que le taux de cholestérol LDL n'est pas significativement différent chez les patients atteints de la MA par rapport à des sujets contrôles (Romas et al. 1999). De plus, une analyse sur dix études effectuées entre 1986 et 1999, révèle que les taux de cholestérol

sont significativement plus bas chez les patients atteints de la MA par rapport à contrôles (Romas et al. 1999; Knittweis and McMullen 2000).

Cependant d'autres études contredisent ces résultats et avancent que le cholestérol cérébral est augmenté dans la MA. En effet, les chercheurs montrent que les taux de cholestérol LDL sont significativement plus hauts dans le sérum des patients contrairement aux cholestérol-HDL qui sont significativement plus bas (Kuo et al. 1998). Kivipelto et al. montrent en 2001 un lien significatif entre un taux de cholestérol élevé et une plus grande susceptibilité de développer la MA (Miia Kivipelto et al. 2001). Une étude récente a mis en évidence une augmentation significative du cholestérol présent dans le plasma de patients atteints de la MA de 10%, par rapport à des contrôles (Popp et al. 2013).

Des études ont tenté d'évaluer un potentiel lien existant entre le taux de cholestérol mesuré chez des patients âgés de la quarantaine et la susceptibilité de développer la maladie. En 2005, sur 2844 individus présentant de forts taux de cholestérol, 266 individus (entre 40 et 44 ans) ont été identifiés comme étant déments (Whitmer et al. 2005). Une autre étude confirme ces conclusions, montrant que les taux de cholestérol élevés (>220 mg/dl) représentent de façon significative un facteur de risque pour la MA (Solomon, Kivipelto, et al. 2009).

D'autres chercheurs se sont plutôt intéressés à tenter d'établir un lien entre les taux de 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) et la MA. En effet, le 24S-OHC est un marqueur de l'élimination du cholestérol cérébral par l'enzyme CYP46A1, puisque sous cette forme il peut traverser la BHE et quitter le cerveau. Plusieurs équipes ont donc tenté de savoir si le 24S-OHC pourrait constituer un biomarqueur de la maladie. Cependant les résultats sont contradictoires d'une étude à l'autre. Les patients avec un stade avancé de la MA ou de démence ont des taux de 24S-OHC plus faibles dans le plasma (Kölsch et al. 2004; A. Papassotiropoulos et al. 2000; L. Bretillon et al. 2000; Solomon, Leoni, et al. 2009) et dans le LCR (Leoni and Caccia 2013) par rapport à des contrôles. Des taux élevés de 24S-OHC ont été mesurés dans les LCR de malades par rapport à des contrôles (A. Papassotiropoulos et al. 2002), mais dans le plasma ces taux sont similaires. Popp et al. observent l'inverse avec des taux significativement plus élevés dans le plasma des patients contrairement aux taux dans les LCR qui restent inchangés (Popp et al. 2012; Lewczuk et al. 2013). Une augmentation du 24S-OHC à la périphérie pourrait mettre en évidence une accumulation abondante du cholestérol cérébral qui se retrouve hydroxylé en grande quantité par CYP46A1. En effet, les

concentrations en 24-OHC dans la circulation sanguine et le LCR pourraient être augmentées chez les patients atteints de la MA durant les stades cliniques précoces de la maladie en comparaison aux contrôles présentant des fonctions cognitives normales (A. Papassotiropoulos et al. 2002; Lütjohann and von Bergmann 2003).

Récemment, une étude met en évidence une diminution du ratio desmostérol/cholestérol dans le plasma de patients, avec un effet d'autant plus prononcé chez les femmes par rapport aux contrôles (Y. Sato et al. 2015). De plus, les taux de desmostérol sont plus faibles chez les patients atteints de la MA (Wisniewski, Newman, and Javitt 2013). Il a été constaté que ce ratio diminue également dans le cortex et l'hippocampe de rats âgés (Smiljanic, Vanmierlo, and Mladenovic 2013). Sato et al, proposent donc la mesure de ce ratio comme étant un marqueur de la maladie. Une autre étude montre qu'il n'y a pas de différence dans les taux de cholestérol mesurés dans le LCR et le plasma de patients atteints de la MA par rapport aux contrôles (Martínez-Morillo et al. 2014).

Ainsi, toutes ces études mettent en évidence des résultats contradictoires. Pour le moment, on ne peut clairement associer un profil de cholestérol plasmatique avec la MA. On peut supposer que plusieurs facteurs peuvent modifier le profil lipidique sanguin (le stade de la maladie, l'âge des patients, le génotype ApoE ou l'alimentation), ce qui expliquerait les données différentes obtenues.

1.7.1.2 Dans le cerveau

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs facteurs conduisent à la MA tels que la perturbation de l'intégrité de la BHE (Erickson and Banks 2013), un génotype ApoE4 ou encore l'implication de gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol que nous avons cités dans le chapitre 1.4. Tous ces facteurs pourraient conduire à une altération de l'homéostasie du cholestérol cérébral. Ainsi, des études mettent en évidence que le cholestérol cérébral est élevé chez les patients atteints de la MA (Cutler and Kelly 2004; Xiong et al. 2008). Le cholestérol est augmenté dans le gyrus frontal des malades (Cutler and Kelly 2004). En 2008, Xiong et al. détectent également une augmentation de cholestérol total de 41,3% (Xiong et al. 2008) dans les cerveaux de patients par rapport à des contrôles. Cette augmentation de cholestérol a été mise en évidence par des techniques enzymatiques (Amplex

red cholesterol, assay kit-Invitrogen), chimiques et des marquages immunohistologiques à la filipine (molécule fluorescente qui s'incorpore dans les régions riches en cholestérol). De cette façon, les auteurs ont montré un enrichissement du cholestérol autour des plaques séniles et au niveau des neurites dystrophiques. Les auteurs proposent que l'augmentation du cholestérol membranaire entraîne une augmentation de l'activité des sécrétases β et γ . En 2012, la spectrométrie de masse à temps de vol couplé à la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (ToF-SIMS) a permis de mesurer une augmentation du cholestérol cérébral de l'ordre de 30% dans le cerveau de patients atteints de la MA (Lazar et al. 2013). Dans le LCR, le cholestérol diminue d'environ 12% chez les patients (Popp et al. 2012; Popp et al. 2013).

1.7.2 Effets du cholestérol *in vivo* et *in vitro*

Le lien entre le cholestérol et la production de peptides amyloïdes a été établi pour la première fois il y a plus de trente ans. En effet, Sparks et al. mettent en évidence qu'un régime enrichi en cholestérol administré à des lapins induit la présence de plaques amyloïdes dans le parenchyme cérébral (Sparks et al. 1994). De plus, les changements neuropathologiques observés chez ces lapins tels que des altérations comportementales et un volume ventriculaire augmenté sont relativement similaires à ceux observés chez l'homme (Woodruff-Pak, Agelan, and Valle 2011; Stephen Deci 2012; Schreurs, Smith-Bell, and Lemieux 2013). Un régime hypercholestérolémié chez un modèle transgénique de souris exprimant les mutations suédoise (Swedish) et londonienne (London) de l'APP, perturbe l'intégrité de la BHE, augmente l'A β dans les cerveaux et diminue l'A β dans le plasma de ces souris (Löffler et al. 2016). Chez des souris non-transgéniques sauvages (C57BL6) le régime hypercholestérolémié provoque une augmentation de cytokines pro inflammatoires et de fragments C-terminaux β -CTF dans le cerveau, accompagné de déficits mnésiques (Thirumangalakudi et al. 2008). De la même manière dans deux autres études, des modèles de souris transgéniques APP (avec mutation swedish et APP/PS1) soumises à ce type de régime présentent une accumulation d'A β dans le cerveau, avec une augmentation de cholestérol cérébral et plasmatique (Refolo et al. 2000; Levin-Allerhand, Lominska, and Smith 2002).

Une étude très intéressante, montre que la surexpression de SREBP sur des souris triple transgéniques (APP/PS1 surexprimant SREBP) entraîne une accumulation accrue de cholestérol cérébral qui suffit à déclencher la synthèse et l'accumulation d'A β . Les cerveaux

de ces souris révèlent une activation microgliale et une augmentation de la mort neuronale. En effet, la surexpression de SREBP accélère et aggrave la pathologie avec une neuroinflammation prononcée et une dégénérescence synaptique liée à l'âge détectable dès 4 mois et une mort neuronale à 10 mois. Mais ces souris ont la particularité de développer des DNF contrairement aux souris transgéniques simples SREBP indiquant que l'augmentation de cholestérol n'est pas suffisante pour développer l'hyperphosphorylation de tau et son agrégation (Barbero-Camps et al. 2013).

Le cholestérol a été également décrit comme un modulateur du clivage de l'APP dans des cultures de cellules neuronales (Bodovitz and Klein 1996; M. Simons et al. 1998; Eehalt et al. 2003). L'augmentation de cholestérol membranaire conduit à une augmentation de l'endocytose de l'APP par une voie dépendante de la clathrine et par conséquent à une augmentation de la production de peptides A β dans les cellules HEK293 et les neurones (J. C. Cossec et al. 2010; Marquer et al. 2014). Le cholestérol jouerait donc un rôle important dans la pathologie de la MA, et une diminution du cholestérol par déplétion à l'aide de la méthyl- β -cyclodextrine serait bénéfique (Eehalt et al. 2003; M. Simons et al. 1998; Guardia-Laguarta et al. 2009). Cette déplétion n'influence pas le clivage de la γ -sécrétase (Guardia-Laguarta et al. 2009; Kojro et al. 2001; M. Simons et al. 1998). Un traitement à l'hydropropyl- β -cyclodextrine sur des lignées cellulaires et des souris transgéniques réduit le cholestérol membranaire, les taux intracellulaire et extracellulaire d'A β 42, les fragments β -CTF (sans altérer les taux de α -CTF), la pathologie tau et améliore les déficits cognitifs (Yao et al. 2012). De plus, ce traitement engendre une surexpression des gènes impliqués dans le trafic du cholestérol tel qu'ABCA1 sans altérer les taux ARNm de HMGCoA synthase ou réductase.

Des études se sont penchées sur les effets de la dégradation du cholestérol en 24S-OHC, en surexprimant l'enzyme CYP46A1 responsable de cette transformation. La surexpression de CYP46A1 par un vecteur adéno-associé de sérotype 5 (AAV) dans l'hippocampe et le cortex de souris transgéniques APP23 et APP/PS1 entraîne une diminution de la pathologie amyloïde et une amélioration des performances mnésiques des animaux (Hudry et al. 2010). La surexpression de CYP46A1 par injection d'un AAV-CYP46A1 dans l'hippocampe de souris transgéniques THY-tau22 conduit à la restauration des taux de 24S-OHC, une amélioration des performances de la mémoire spatiale, une amélioration des dommages synaptiques et de la fonction neuronale. Cependant la surexpression de CYP46A1 n'a pas d'effet sur la

phosphorylation de tau (Burlot et al. 2015). Les souris transgéniques Knock out pour CYP46A1 révèlent des déficits de mémoire très sévères (Kotti et al. 2006) alors que les souris transgéniques âgées surexprimant CYP46A1 ont des performances cognitives améliorées (Maioli et al. 2013). L'inhibition de l'expression de CYP46A1 diminue les taux de 24S-OHC et augmente les taux de cholestérol dans les neurones d'hippocampe (Djelti et al. 2015). Cette accumulation de cholestérol neuronal engendre une augmentation du recrutement de l'APP dans les radeaux lipidiques et une augmentation de la protéine tau phosphorylée (à la position thréonine 118), une mort apoptotique des neurones et une atrophie de l'hippocampe. *In vitro*, le 24S-OHC induit un efflux du cholestérol provenant des astrocytes, médié par l'ApoE par une voie impliquant les récepteurs LXR (Abildayeva et al. 2006). Plusieurs études ont montré un effet bénéfique des agonistes des récepteurs LXR sur les déficits cognitifs de souris transgéniques (Sodhi and Singh 2014; Donkin et al. 2010; Fitz et al. 2010; Vanmierlo et al. 2011). Mais cette restauration de la mémoire n'est pas médiée par la voie impliquant les récepteurs LXR que ce soit chez les souris transgéniques CYP46A1 (Shafaati et al. 2011) ou par injection avec un AAV-CYP46A1 dans des modèles de la pathologie amyloïde (Hudry et al. 2010) ou de la pathologie tau (Burlot et al. 2015).

1.7.3 Dans les radeaux lipidiques

Le clivage de l'APP par les sécrétases est retrouvé dans les radeaux lipidiques (S. J. Lee et al. 1998; Golde and Eckman 2001; D R. Riddell et al. 2001). En dehors de ces radeaux lipidiques, le clivage prédominant est celui de la voie non-amyloïdogénique impliquant l' α -sécrétase (Hartmann, Kuchenbecker, and Grimm 2007; Vetrivel and Thinakaran 2010). Des études *in vitro* et *in vivo* ont pu montrer que le cholestérol cellulaire module le clivage par la γ -sécrétase et la production d'A β (M. Simons et al. 1998; Refolo et al. 2000; Fassbender et al. 2001). Le cholestérol a donc un rôle important sur la production d'A β .

La β -sécrétase est principalement localisée dans les radeaux lipidiques et clive l'APP. Comme nous l'avons vu précédemment l'APP palmitoylé est spécifiquement enrichi dans ces microdomaines et sa palmitoylation augmente le clivage de la β -sécrétase. Une inhibition de l'ACAT réduit jusqu'à 76% la palmitoylation de l'APP. Les auteurs suggèrent que l'utilisation d'un inhibiteur de l'ACAT serait une stratégie thérapeutique pour le traitement de la MA (Bhattacharyya, Barren, and Kovacs 2013). La palmitoylation des domaines

transmembranaire et cytosolique de la β -sécrétase serait à l'origine de sa localisation dans les radeaux lipidiques (Benjannet et al. 2001; Vetrivel et al. 2009; Bhattacharyya, Barren, and Kovacs 2013).

La localisation de l'APP dans les radeaux lipidiques est dépendante du cholestérol et contribue à son endocytose, en favorisant la voie amyloïdogénique (Yoon et al. 2007; A. Schneider et al. 2008; J. C. Cossec et al. 2010). De plus, un site de liaison entre C99 (protéine résultant du clivage de l'APP par la β -sécrétase) et le cholestérol a été décrit par des études structurales de RMN (Beel et al 2008, Barrett et al 2012). Une augmentation de cholestérol membranaire permet une relocalisation de l'APP et de la β -sécrétase dans les radeaux lipidiques (Marquer, Lévêque-Fort, and Potier 2012), augmentant ainsi son accessibilité pour la β -sécrétase. Une augmentation de cholestérol entraîne une augmentation de l'activité de la γ -sécrétase, favorisée dans les radeaux lipidiques et donnant naissance aux peptides A β 38, 40 ou 42 (Matsumura et al. 2014). À l'inverse une déplétion du cholestérol membranaire permet une délocalisation de la β -sécrétase des radeaux lipidiques (David R. Riddell et al. 2001; Eehalt et al. 2003), diminue l'activité de la γ -sécrétase (S. Wahrle et al. 2002; Urano 2005; Osenkowski et al. 2008), diminue l'association de l'APP avec les radeaux lipidiques et réduit la sécrétion d'A β (M. Simons et al. 1998). Toutes ces données mettent en lumière l'implication du cholestérol dans la relocalisation de l'APP dans les radeaux lipidiques et dans la sécrétion de peptides amyloïdes. Plus précisément, le site de liaison du cholestérol qui fait l'objet de mes travaux de thèse, pourrait être responsable de ces mécanismes. Cette partie sera abordée dans le chapitre 1.8.

Ainsi, moduler le cholestérol membranaire permet de moduler la localisation de l'APP dans les radeaux lipidiques et donc de moduler la sécrétion de peptides amyloïdes. Pour cette raison, des études ont tenté d'étudier l'effet bénéfique de molécules pouvant inhiber la synthèse de cholestérol dans le but de réduire le clivage amyloïdogénique de l'APP. Le cholestérol est donc une cible thérapeutique dans la pathologie de la MA.

1.7.4 Les traitements ciblant la synthèse de cholestérol : les statines

Les statines, inhibiteurs de la HMGCoA réductase (enzyme initiale et limitante de la synthèse du cholestérol) sont utilisées dans les essais thérapeutiques afin de cibler la voie de synthèse du cholestérol. Il existe deux types de statines classés selon leur solubilité : les statines

lipophiles qui traversent la barrière BHE (simvastatine, lovastatine, atorvastatine) et les statines un peu plus hydrophiles (pravastatine, fluvastatine) qui traversent plus difficilement la BHE. Les statines ont pour fonction principale de diminuer les taux de cholestérol mais présentent des effets pléiotropes comme des actions anti-inflammatoires (Lyons et al. 2011; Zhang et al. 2013) et antioxydantes (Piermartiri et al. 2010).

Une étude contrôle sur des personnes âgées de plus 50 ans a suggéré que les statines pourraient réduire le développement de la démence. Cet effet serait indépendant des taux lipidiques contenus dans le sérum. Mais ces données ne distinguent pas les formes de démences existantes de la MA (Jick et al. 2000). Une large étude a été menée en 2008 avec 6992 personnes suivies sur une durée moyenne de 9 ans (Haag et al. 2009). Sur les 6992 personnes suivies, 582 personnes ont développé la MA. Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'utilisation de statines est associée à une réduction du risque d'avoir la MA (en comparaison à des individus n'ayant pas été soumis à des hypocholestérolémiants). Cet effet protecteur des statines est indépendant du caractère lipophile ou non des statines et du génotype ApoE. Swiger et al. publient en 2013, une revue basée sur l'analyse de plusieurs études (27 études) et examinent les effets des statines sur les effets cognitifs à long terme et à court terme chez des patients sans antécédents de troubles cognitifs et concluent sur un possible effet protecteur des statines sur les démences (Swiger et al. 2013).

Des expériences sur des animaux mais également sur des cultures cellulaires démontrent qu'un traitement avec des statines provoque une diminution de la production d'A β (Fassbender et al. 2001), notamment des β -CTF dans les cultures primaires de neurones (Shinohara et al. 2010). Les statines améliorent les fonctions cognitives, réduisent les plaques séniles et diminuent la phosphorylation de tau chez les souris transgéniques APP âgées (Kurata et al. 2011). Néanmoins, l'effet des statines reste très controversé car d'autres études montrent une diminution des niveaux d'APP mature mais pas d'effet sur les β -CTF dans des cultures neuronales (Hosaka et al. 2013) ou encore une augmentation des taux d' α et β -CTF dans les lignées neuronales N2a (Ostrowski et al. 2007).

Les enzymes neprilysine (NEP) et Insulin-degrading enzyme (IDE) sont importantes pour la dégradation de l'A β dans le cerveau et des altérations de leur expression pourraient promouvoir le dépôt amyloïde chez les patients sporadiques (Caccamo et al. 2005; S. Wang et al. 2010). Une étude *in vitro* montre que les statines lipophiles simvastatine et atorvastatine induisent une dégradation de l'A β 40 exogène administré dans le milieu extracellulaire

d'astrocytes corticaux, mais également une sécrétion des peptidases neprilysine NEP dans le milieu extracellulaire médiées par l'activation de la voie ERK (Yamamoto et al. 2016).

In vivo, le traitement aux simvastatines sur des souris transgéniques APP (exprimant la mutation suédoise) aurait un effet bénéfique avec une diminution de la charge amyloïde. Néanmoins, ce traitement ne réduit pas l'activation microgliale, l'astrocytose et n'améliore pas la mémoire spatiale chez ces souris (Papadopoulos, Tong, and Hamel 2014). En revanche un pré- traitement aux fluvastatines avant injection simple d'A β 40 sur des souris, diminue les déficits cognitifs, la charge amyloïde et le stress oxydatif, contrairement aux simvastatines (Kurinami et al. 2008). Le traitement à la pitavastatine et à l'atorvastatine améliore les déficits mnésiques, réduit les plaques séniles, les neurites dystrophiques tau positives à chez des souris transgéniques âgées (entre 15 et 20 mois), sans affecter les taux lipidiques présents dans le sérum (Kurata et al. 2011). Une étude montre qu'un traitement aux statines permet d'augmenter la phagocytose des macrophages, et diminue les taux de cholestérol cellulaire en augmentent parallèlement l'expression de ABCA7. Un Knock out d'ABCA7 supprime la phagocytose. Cette étude met en relation l'homéostasie du cholestérol et la phagocytose (Tanaka et al. 2011).

Bien que les données sur l'implication du cholestérol soient controversées, nous avons pu voir que les lipides sont impliqués dans la pathologie de la MA et plus particulièrement le cholestérol. L'APP par ses différents domaines de liaison, peut présenter des interactions lipide-proteine ou protéine-protéine conduisant à différents mécanismes moléculaires.

1.8 L'APP et ses domaines d'interactions

1.8.1 Interaction lipide-protéine

1.8.1.1 Le site de liaison du cholestérol de l'APP

La MA est étroitement liée à l'homéostasie des lipides. De plus, le clivage de l'APP par les sécrétases intervient au niveau de la membrane plasmique, ce qui suggère que l'environnement lipidique est important pour la production de peptides amyloïdes. Le cholestérol est fortement impliqué dans la pathologie et c'est la raison pour laquelle de

nombreuses études que nous avons évoquées se sont intéressées à la modulation du cholestérol membranaire, à son efflux et à une possible corrélation entre le cholestérol et la pathologie.

En 2008, Beel et al. mettent en évidence un site de liaison entre C99 la protéine résultant du clivage de l'APP, et le β -cholbimalt (un analogue du cholestérol). Dans cette étude, les auteurs décrivent par résonance magnétique nucléaire (RMN) plusieurs acides aminés impliqués dans cette interaction (Beel et al 2008). Quatre ans plus tard, la même équipe publie une seconde étude et révèle par RMN et Alanine-scanning (mutagenèse en alanine) de nouveaux résultats avec une liste différente d'acides aminés impliqués dans cette interaction (Barrett et al. 2012). Cette dernière étude a permis d'étudier la structure RMN du fragment C-terminal de l'APP dans des micelles de lipides contenant les lyso-myristoyl phosphatidylglycérols (Barrett et al. 2012). Ainsi, ces études structurales, couplées par des études de titration du cholestérol ont permis de révéler ce site de liaison du cholestérol (SLC) (Figure 21).

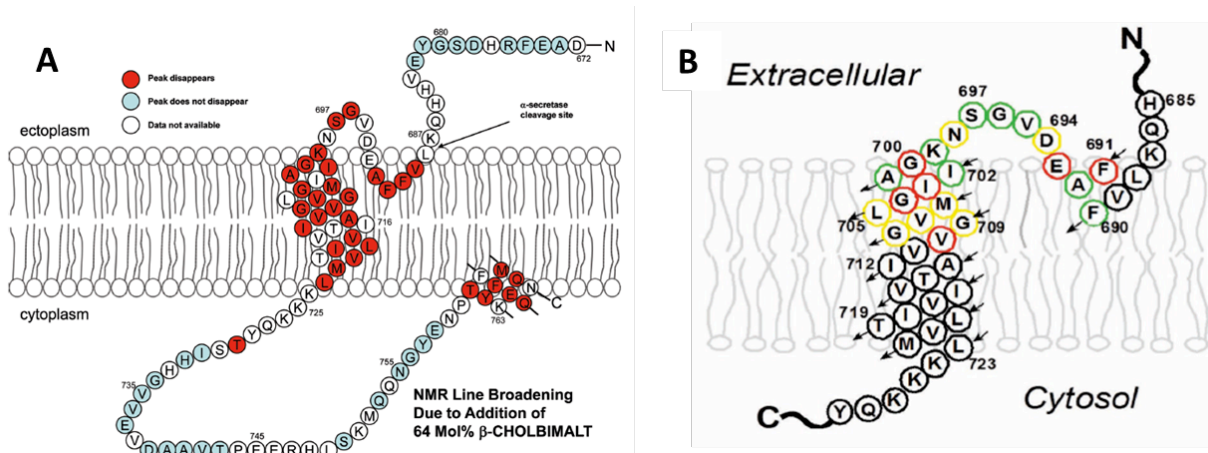


Figure 21 : Représentation schématique de C99.

A : Les acides aminés en rouges sont très fortement impliqués dans l'interaction avec le cholbimalt (Beel et al. 2008). **B** : Représentation des résultats de l'Alanine-scanning et de la RMN. La mutation en alanine des acides aminés entourés en rouge, jaune ou vert inhibe, atténue ou n'a pas d'effet sur l'interaction avec le cholestérol respectivement (Barrett et al. 2012). La numérotation des acides aminés se réfère à l'APP770.

Ces deux études structurales révèlent que le motif de glycines GxxxGxxxG est impliqué dans cette interaction. La liaison du cholestérol à cet endroit est probablement influencée par les liaisons hydrogènes des résidus N698 et E693 et des liaisons van der Waals (Barrett et al.

2012). Le SLC est situé entre deux sites de clivages : le clivage de l' α et la γ -sécrétase. Cette localisation suggère que la liaison du cholestérol peut interférer avec le clivage de l'APP.

Di Scala et al, se sont penchés sur l'étude de l'interaction de peptides wild-type A β 22-35 et du cholestérol par une méthode biophysique : la méthode de Langmuir (Di Scala et al. 2013; Thakur, Micic, and Leblanc 2009). Une monocouche de lipides constituée de cholestérol est préparée et des peptides sont ajoutés dans la surface aqueuse. L'interaction entre les peptides et le cholestérol est quantifiée en mesurant la pression de surface de la monocouche de lipides à l'aide d'un micro tensiomètre. Lorsque les peptides wild-type A β 22-35 sont déposés à la surface, une importante augmentation de la pression de surface est constatée atteignant 18mN/m. En revanche, les peptides mutants (V24G, K28G/R, V24G/K28G) A β 22-35 engendrent une pression de surface mesurée entre 5 et 10 mN/m, indiquant que ces acides aminés sont impliqués dans l'interaction avec le cholestérol (Di Scala et al. 2013).

Plusieurs études se sont intéressées aux effets de certaines mutations de l'APP sur la modulation de la sécrétion de peptides amyloïdes. L'équipe de Ren et al, s'est intéressée aux acides aminés présents dans le site de liaison du cholestérol de l'APP, sur la partie juxtamembranaire (Figure 22 en vert). Leurs résultats révèlent un important rôle du motif juxtamembranaire GSNK sur le clivage de la γ -sécrétase et la production d'A β (Ren et al. 2007). Les auteurs montrent que les HEK transfectées avec les mutants S26L et K28S (correspondant aux acides aminés S697 et K699 avec la numérotation selon l'APP770) présentent une diminution importante d'A β total et d'A β 40 extracellulaire, avec un effet plus drastique pour le mutant K28S. De plus, la mutation du motif entier juxtamembranaire GSNK en SLSS engendre une diminution des taux d'A β tout aussi importante que le mutant K28. En présence de N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT), un inhibiteur de la γ -sécrétase, il n'y a pas de différence constatée au niveau des taux d'A β extracellulaires. De plus, la diminution de la production d'A β par les mutations S26L et K28S, permettent de mettre en lumière un motif GSNK décrit comme activateur de la production d'A β (Ren et al. 2007). Une étude a montré par spectrométrie de masse que les mutations K28A et K28Q entraînent un décalage du clivage de la γ -sécrétase, entraînant la formation de peptides plus courts entre 33 et 40 acides aminés, sans affecter la quantité totale de peptides amyloïdes (Kukar et al. 2011). Une mutation au niveau de ce site juxtamembranaire est donc protectrice.

Par ailleurs, le motif LVFFAED de l'APP (acides aminés L17 à A21 sur la figure 22 en rouge) semble également être un motif critique impliqué dans la production d'A β (Tian et al. 2010). Au sein de ce motif, l'acide aminé à la position 21 est impliqué dans la mutation Flemish A21G que nous avons décrit dans le chapitre précédent (partie 1.4.1). Cette mutation, située dans le SLC, est connue pour augmenter considérablement les taux d'A β 40 et 42 (environ 2,4 fois) sans altérer le clivage de l' α -sécrétase (De Jonghe et al. 1998; Tian et al. 2010). Une question principale se pose, à savoir comment la seule suppression d'un groupement methyl influence dramatiquement la production d'A β ? Tian et al. décrivent la séquence L17-V18-F19-F20-21 comme étant un motif inhibiteur de la production d'A β . La mutation Flemish A21G perturberait donc ce motif inhibiteur. De plus, une mutation du motif entier LVFF en AAAA induit également une augmentation d'A β extracellulaire dans des cellules d'ovaire de hamster chinois CHO (Tang et al. 2014). La mutation A21G induit de grandes variations de déplacements chimiques par RMN des acides aminés F19, F20 et G29. De plus, cette mutation perturbe la structure en feuillet β au niveau du motif LVFF et induit une structure secondaire en hélice au niveau du motif juxtamembranaire G25-SNK-G29. En conclusion, cette mutation induit de vastes changements conformationnels de l'APP, rendant certainement plus favorable C99 au clivage de la γ -sécrétase (Tang et al. 2014). Les acides aminés adjacents E22 et D23 n'ont aucun effet sur la structure secondaire de C99. Et de façon intéressante l'extension du motif LVFF avec la mutation A21F diminue la sécrétion d'A β , alors que l'extension du motif E22-D23 par la mutation A21E augmente la production d'A β de manière similaire à la mutation A21G.

Le fait que l'introduction de la glycine par la mutation A21G fasse apparaître un motif GxxxG, et qu'elle rende la structure contenant le motif G29-SNK-G29 plus hélicoïdale suggère qu'elle influence la dimérisation du domaine transmembranaire. En effet, les auteurs montrent que les peptides contenant la mutation A21G se dimérisent avec les peptides wt par le motif G33xxxG37 transmembranaire (Tang et al 2014). Une fois encore, cela prouve que le motif LVFFAED est inhibiteur et que la mutation A21G au sein de ce motif juxtamembranaire influence la structure transmembranaire. Les auteurs montrent également, que la dimérisation est facilitée par le domaine juxtamembranaire G25-SNK-G29 situé à l'interface, chez les mutants A21G, et que le cholestérol aide à la stabilisation de cette interface.

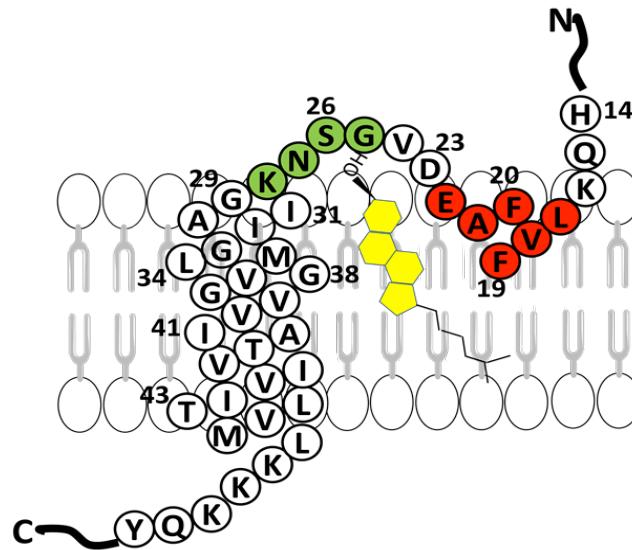


Figure 22 : Représentation schématique de C99 transmembranaire au niveau du site de liaison du cholestérol de l'APP.

En vert et rouge sont indiqués les domaines inhibiteur et activateur de la production d'A β décrits par Ren et al 2007 et Tian et al 2010. Le cholestérol est indiqué en jaune.

Ainsi le cholestérol et la mutation A21G, engendrent de vastes changements structuraux dans la séquence extracellulaire LVFFAEDVGSNK qui conduisent à la réduction des effets inhibiteurs du motif LVFFAED et favorisent la dimérisation.

Les glycines transmembranaires ont fait l'objet de plusieurs études du fait de leur implication dans la dimérisation de l'APP. Les glycines sont fréquemment retrouvées dans les hélices transmembranaires (Lemmon et al. 1992) et les motifs GxxxG sont connus pour être des motifs de dimérisation. La région transmembranaire de l'APP est particulièrement riche en motifs GxxxG et la mutation A21G engendre l'apparition d'un motif GxxxG supplémentaire. La structure en dimère du domaine transmembranaire de l'APP a été décrite dans des micelles de détergent (Nadezhdin et al. 2012) et dans des bicouches membranaires (Takeshi Sato et al. 2009). Dans des bicouches membranaires de dimyristoyl-phosphocholine (DMPC) et de dimyristoylphosphoglycerol (DMPG), la dimérisation se fait au niveau du motif G29xxxG33xxxG37 (Takeshi Sato et al. 2009). En revanche, dans les micelles de dodecylphosphocholine, la dimérisation se fait au niveau du motif G38xxxG42 (Nadezhdin et al. 2012).

Plusieurs études se sont intéressées à ces motifs et ont montré que les mutations au sein de ces motifs altéraient le clivage des fragments β -CTF (Kienlen-Campard et al. 2008; Munter et al. 2007). Munter et al, expliquent que le mutant G33A atténue la dimérisation plus efficacement

que le mutant G29A (Munter et al. 2007), et la double mutation en alanine sur les deux glycines a un effet additif sur l'abolition de la dimérisation. Les auteurs ont également mis en place la mutation en isoleucine G33I et ont montré que cette mutation réduit encore plus drastiquement la dimérisation que le double mutant G29A/G33A. Par un modèle de calcul mathématique, les auteurs stipulent que l'état conformationnel des deux glycines est favorable à l'état de dimerisation et que les positions 29 et 33 sont des positions clés pour la dimérisation. Les simples mutants G25A, G29A et G33A n'ont pas d'effet sur les taux d'A β extracellulaires, en revanche les taux d'A β 42 subissent des diminutions importantes de 28, 67 et 60%. Les mutants G29A/G33A et G33I diminuent les taux d'A β 40 et 42 avec un effet plus important pour le simple mutant G33I avec parallèlement une augmentation des formes plus courtes d'A β (38, 37,34 et 35). Dans cette étude, le clivage de la γ -sécrétase serait affecté mais pas celui de la β -sécrétase. La substitution de la glycine à la position 33 par un acide aminé plus volumineux tel que l'isoleucine perturbe la stabilité du domaine transmembranaire.

Le double mutant transmembranaire G29A/G33A ne modifie pas les taux d'A β extracellulaires (contrairement à Munter et al.), contrairement au mutant G29L/G33L (Kienlen-Campard et al. 2008). Dans cette étude, les auteurs démontrent qu'il n'y a pas de différence de la localisation subcellulaire du double mutant G29L/G33L, que les taux de fragments solubles sAPP β restent inchangés et que les taux d'A β 40 et 42 diminuent drastiquement. Les mutations en leucine engendrent donc une diminution du clivage de la γ -sécrétase mais sans affecter les taux d'AICD produits. Cependant de façon surprenante, cette double mutation favorise la formation de dimères d'APP. Lorsque l'on analyse les mutations de façon individuelle, G29L est moins favorable à la formation de dimères et G33L suffit à elle seule pour engendrer des taux équivalents au double mutant de dimérisation.

Les dimères observés par western blot avec les mutations G29L/G33L dans les lysats cellulaires par Kienlen-Campard sont en réalité déterminés comme oligomères d'A β 42 (Decock et al. 2016). En effet, les mutations en leucine aux positions 29 et 33 engendrent une augmentation des oligomères dans les lysats de cellules CHO et le simple mutant G33L est suffisant pour induire à lui seul l'oligomérisation (Decock et al. 2016). À l'inverse, le double mutant G33L/G38L situé au niveau du dernier motif GxxxG transmembranaire, réduit l'oligomérisation. Ces résultats confirment des résultats obtenus par Harmeier et al, qui montrent que le mutant G33 permet la formation d'oligomères de plus haut poids moléculaire

(Harmer et al. 2009). En revanche, si la mutation du motif G29xxxG33 affecte l'oligomérisation, elle n'a aucun effet sur la dimérisation de l'APP. Et de façon intéressante il n'existe pas de corrélation entre la dimérisation et la production d'A β (Decock et al. 2015; So et al. 2013; Jung, Premraj, et al. 2014). La mutation du motif G38xxxA42/L38xxxL42 abolit la formation des oligomères d'A β (Decock et al. 2016). Ainsi, deux résidus sont critiques pour l'oligomérisation : la G33 inhibe l'oligomérisation alors que la G38 la promeut. De plus, les oligomères d'A β sont formés dans le compartiment intracellulaire et sont ensuite excrétés dans le milieu. Les oligomères contenus dans le milieu extracellulaire ne sont quant à eux pas réabsorbés.

En résumé, trois groupes de séquences du SLC jouent un rôle important sur le clivage de l'APP et la formation d'oligomères. Les séquences GNSK et LVFF ont des rôles opposés avec une activation ou une inhibition de la production d'A β respectivement. La partie transmembranaire comprenant les motifs de GxxxG jouant un rôle clé dans l'oligomérisation contrôlée par deux des deux glycines aux positions G33 et G38. L'APP se dimérise 5 fois plus que les fragments CTF, la partie extramembranaire joue donc un rôle important dans la dimérisation (Decock et al. 2015; Kaden et al. 2008; Ben Khalifa et al. 2012). Mais ces acides aminés apparaissent tous comme étant impliqués dans l'interaction avec le cholestérol. Les mutations effectuées au niveau du site de liaison du cholestérol doivent certainement engendrer des changements conformationnels de la protéine, et par conséquent modifier son clivage par les sécrétases, ce qui conduirait à une diminution ou une augmentation de la production d'A β .

Pour toutes ces raisons le SLC pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle. Di Scala et al, publient une étude sur le bexarotène et montrent que cette molécule présente une structure comparable avec celle du cholestérol (Scala et al. 2014). Le bexarotène possède une structure similaire à celle du cholestérol et pourrait interférer avec la liaison de l'APP et du cholestérol. Nous aurions une compétition avec le cholestérol, ce qui entraînerait une diminution de la production d'A β . *In vivo*, un traitement au bexarotène pendant une période de 14 jours sur des souris transgéniques APP/PS1 permet une diminution de 50% le dépôt d'A β en 72 heures (Cramer et al. 2012) accompagnée d'une réduction des déficits cognitifs. Durant le traitement les taux d'ApoE, ABCA1 et ABCG1 sont augmentés. Des études ont confirmés la diminution d'A β dans d'autres modèles transgéniques tels que les souris APP : ApoE humain Knocked In (Fitz et al. 2013) ou encore des souris transgéniques 5xFAD

(Veeraraghavalu et al. 2013) ; et de modèles cellulaires *in vitro* (Bachmeier et al. 2013). Le traitement au bexarotène diminue les taux d'A β 40 et 42 dans le fluide interstitiel des souris (Cramer et al. 2012; Ulrich et al. 2013). Cependant, cette réduction n'est pas observée chez les souris ApoE Knock out, ce qui signifie bien que la clairance de l'A β soluble dans le fluide intersitiel est dépendante de l'ApoE. L'augmentation des taux d'ACA1 et ABCG1 est confirmée par d'autres études (Cramer et al. 2012; Boehm-Cagan and Michaelson 2014). Le bexarotène semble augmenter les taux d'ApoE d'origine murine (Price et al. 2013; Veeraraghavalu et al. 2013) mais n'affecte pas les taux d'ApoE d'origine humaine chez les souris transgéniques ApoE knocked in. Boehm-Cagan et al, montrent que le traitement de souris ApoE3 et ApoE4 kocked in engendre une augmentation de la lipitation des apolipoprotéines (dans l'hippocampe). Ces résultats conduisent donc à l'hypothèse que le bexarotène (agoniste des récepteurs RXR) augmente l'expression de ABCA1 et ABCG1 pour promouvoir la lipitation des apolipoprotéines et par conséquent une meilleure clairance de l'A β (Boehm-Cagan and Michaelson 2014). En plus, de réduire la pathologie amyloïde, le bexrotene agit sur la pathologie tau en réduisant la phosphorylation de tau.

1.8.1.2 Interactions de l'A β avec les lipides membranaires

L'A β est connue pour interagir très fortement avec les bicouches lipidiques (Terzi, Hölzemann, and Seelig 1997). La taille des agrégats d'A β et leur hydrophobicité ont été corrélées avec une diminution de la fluidité membranaire (Kremer et al. 2000). L'A β se lie aux gangliosides GM1 (Yanagisawa et al. 1995) et la fibrillogénèse de l'A β a été étudiée dans les radeaux lipidiques de la membrane contenant des groupes de gangliosides (Kakio et al. 2002). Après liaison de l'A β dans un modèle membranaire de radeaux lipidiques composé de monosialoganglioside GM1 / cholestérol / sphingomyéline (1/1/1), l'A β est capable de se transloqué dans les membranes composées de phosphatidylcholine (Kakio et al. 2003). De façon intéressante, les auteurs mettent en évidence une compétition entre le processus de translocation et l'oligomérisation des peptides (Kakio et al. 2003). D'autres études mettent en évidence une interaction des peptides A β avec les gangliosides membranaires, qui favoriserait la formation des fibrilles (McLaurin and Chakrabartty 1996; Choo-Smith et al. 1997; Kakio et al. 2002). Ainsi, la liaison de l'A β aux gangliosides situés dans les radeaux, notamment les gangliosides GM1, induit un changement conformationnel du peptide conduisant à son

oligomérisation, à sa sortie des radeaux et à la formation de fibrilles. De plus, le rôle des gangliosides dans la MA est appuyé par le fait que les concentrations en GM1 et GM2 sont augmentées dans le cortex frontal des patients atteints de la MA (Pernber et al. 2012).

1.8.2 Interactions protéine-protéine

Nous l'avons vu précédemment, l'APP subit plusieurs clivages protéolytiques aboutissant à la libération de fragments (paragraphe 1.8.2). L'APP peut interagir avec ses propres fragments. En effet, au niveau de la surface cellulaire, le large domaine extracellulaire peut interagir avec différents composants de la matrice extracellulaire tels que les protéoglycanes à héparane sulfate (Bush et al. 1994), la laminine et le collagène (Breen 1992; Behr et al. 1996).

L'APP présente plusieurs domaines de liaison aux protéines représentés dans la figure 23 ci-dessous (Nicolas and Hassan 2014).

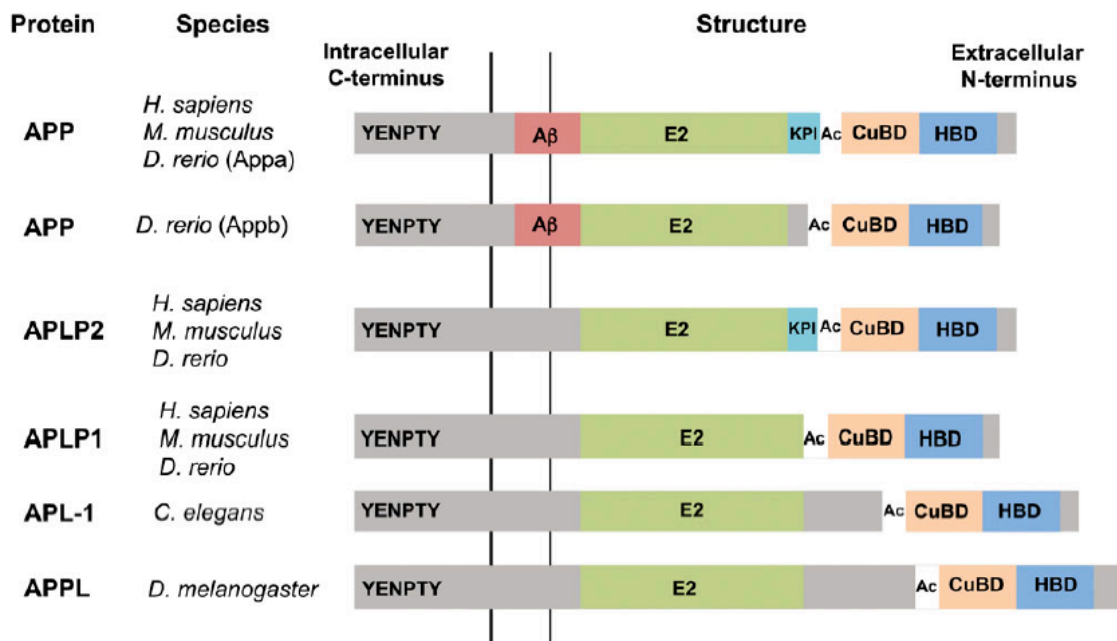


Figure 23 : Structure des protéines membres de la famille APP dans différentes espèces.

La structure du domaine des (*H. sapiens*) APP et ses homologues chez la souris (*M. musculus*), le poisson zèbre (*D. rerio*), le ver (*C. elegans*) et la mouche du vinaigre (*D. melanogaster*) est représentée. Les domaines extracellulaires contiennent un domaine central E2 (en vert), un domaine acide (Ac), un domaine de complexe de liaison au cuivre (CuBD) et un domaine de liaison à l'héparine (HBD), qui sont tous conservés à travers les espèces. Un domaine inhibiteur de protéase Kunitz (KPI), soumis à des épissages, se trouve également dans l'APP et l'APLP2. Le domaine intracellulaire contient le motif YENPTY conservé dans toutes les espèces. En revanche, la séquence de l'Aβ n'est présente que dans APP (Nicolas and Hassan 2014).

La partie N-terminale de l'APP se lie à l'héparine de manière pH et zinc dépendante, et cette interaction favorise la formation d'homodimères (Bush et al. 1994; Gralle et al. 2006; Multhaup 2006; Dahms et al. 2010). C'est plus précisément le fragment soluble N-terminale de l'APP, sAPP α qui possède un domaine de liaison à l'héparine (domaine HBD, Figure 23) (Gralle et al. 2006). Le fragment soluble sAPP α perturbe la dimérisation de l'APP au niveau de la surface cellulaire, ce qui confirme son caractère neuroprotecteur (Furukawa et al. 1996; Gralle, Botelho, and Wouters 2009; Copanaki et al. 2010). Les effets de l'héparine sont contradictoires. En effet, l'héparine peut favoriser l'agrégation de l'A β 1-28 (Klajnert et al. 2006) et limiter l'activité pro-inflammatoire et toxique de l'A β de manière dose dépendante (Bergamaschini et al. 2002).

Au niveau de sa partie C-terminale, l'APP présente un motif intracellulaire d'endocytose « YENPTY ». Des mutations au sein de ce domaine engendrent une inhibition de l'internalisation de l'APP et diminuent la production d'A β (Perez et al. 1999). Ce motif est capable d'interagir avec de nombreuses protéines adaptatrices, contenant des domaines phosphotyrosines, telles que Fe65, Mint1 (appelée X11 α), Dab1 et les membres de la famille interagissant avec les protéines JNK (c-Jun-N-terminale Kinase) (Thinakaran and Koo 2008). La surexpression de Mint1, Mint2 ou Fe65 entraîne une réduction des dépôts d'A β dans les cerveaux de souris transgéniques (Miller et al. 2006). Ces protéines adaptatrices pourraient donc avoir un rôle physiologique dans le clivage de l'APP. Il a été montré que la phosphorylation de la thréonine 668 (située 14 acides aminés près du motif YENPTY) réduit l'interaction entre l'APP et Fe65 et facilite le clivage de l'APP par BACE1 (Ando et al. 2001; M.-S. Lee et al. 2003).

Ainsi, l'APP par ses différentes interactions et plus principalement par ses interactions avec le cholestérol module la sécrétion de peptides amyloïdes. Le SLC serait donc au cœur des mécanismes, conduisant à la pathologie de la MA. Il est par conséquent important de comprendre les mécanismes cellulaires qui découlent de cette interaction.

Objectifs

1.9 Objectifs de la thèse

Mon équipe s'intéresse particulièrement à l'implication du cholestérol dans la MA. Comme nous avons pu le voir de nombreuses études convergent vers le rôle du cholestérol cérébral dans la MA (Di Paolo and Kim 2011). La quantité de cholestérol est plus élevée dans les cerveaux de patients atteints de la MA (Cutler et al 2004, Xiong et al 2008). Dans des études post mortem, l'équipe a montré que le cholestérol s'accumule dans les plaques séniles (Panchal et al 2010, Lazar et al 2013).

In vivo, l'équipe a mis en évidence qu'une augmentation d'environ de 30% de cholestérol à la membrane plasmique dans des lignées de cellules HEK et sur des cultures primaires de neurones conduit à : 1) une relocalisation de l'APP et de BACE1 dans les radeaux lipidiques, microdomaines membranaires enrichis en cholestérol (Marquer et al 2011), 2) une augmentation de l'endocytose de l'APP et 3) une sécrétion accrue d'A β 42 (Marquer et al 2014, Marquer et al 2011, Cossec et al 2010). De plus, l'équipe a observé la présence d'endosomes élargis après augmentation du cholestérol à la membrane plasmique (Cossec et al 2010, Marquer et al 2014). Les endosomes élargis sont un signe morphologique caractéristique retrouvé dans les neurones de patients MA et de trisomiques (Cataldo et al 2000).

Le cholestérol joue donc un rôle central dans la physiopathologie de la MA. Plus particulièrement, l'allèle ϵ 4 du gène de l'ApoE (transporteur majeur du cholestérol cérébral) est le principal facteur de risque de la MA (Amouyel et al. 1993, Corder, Saunders et al. 1993, Strittmatter et al. 1993). L'ApoE est également retrouvée dans les plaques amyloïdes (Namba et al 1991).

Deux études basées sur une analyse structurale par RMN, ont déterminé un site de liaison entre l'APP (plus précisément le fragment C-terminal C99) et le cholestérol impliquant plusieurs acides aminés (Beel et al 2008, Barrett et al 2012). J'émetts donc l'hypothèse que des mutations du site de liaison du cholestérol pourraient abolir l'interaction entre l'APP (Figure 24, **étape 1**) et le cholestérol et par conséquent engendrer une diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes (Figure 24, **étape 4**).

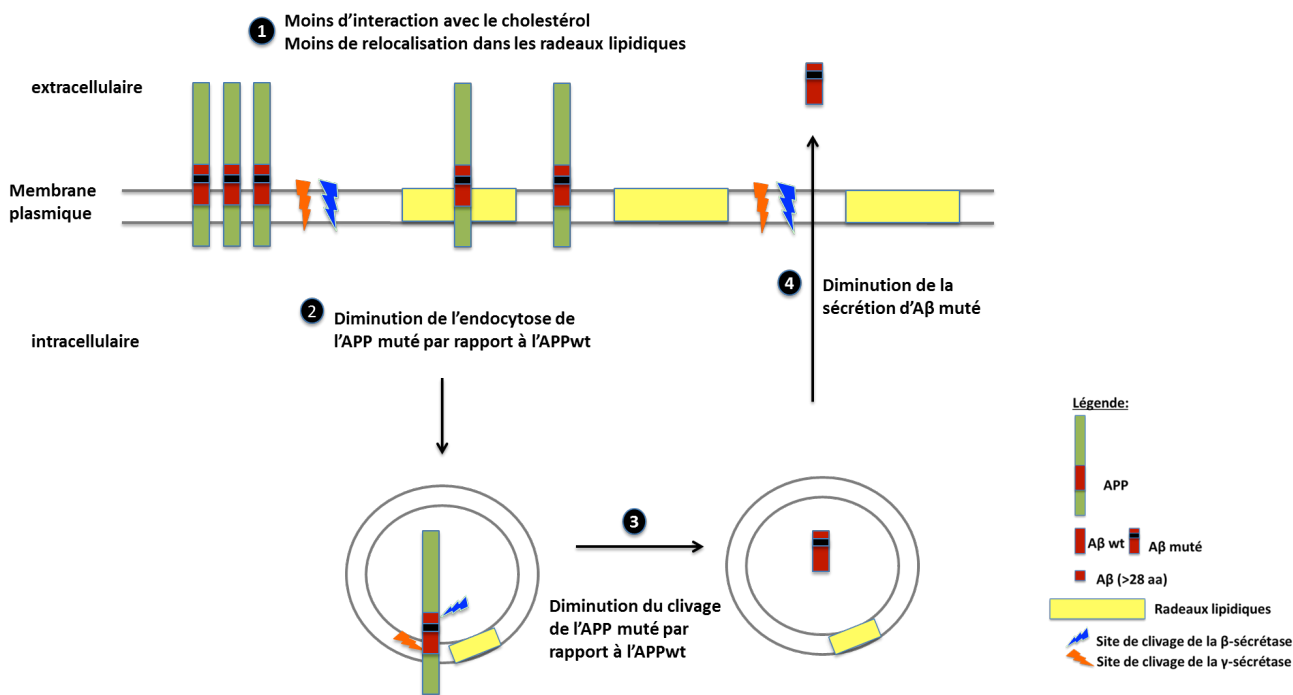


Figure 24 : Hypothèse de l'étude du SLC (APP muté).

La mutation de l'APP transmembranaire au niveau du site de liaison du cholestérol (en vert l'APP, avec la séquence de l'Aβ mutée représentée en rouge et la mutation en noir) entraîne une diminution de son interaction avec le cholestérol, conduisant à une diminution de la production de peptides amyloïdes dans l'espace extracellulaire.

Les objectifs de ma thèse sont donc :

1. Analyser le site de liaison du cholestérol de l'APP par approche de mutagenèse dirigée et par résonance de plasmon de surface
2. Analyser la localisation subcellulaire des mutants du site de liaison du cholestérol et de l'APP
3. Etudier les effets des mutations sur le clivage des mutants par les sécrétases
4. Analyser les effets du génotype ApoE sur la sécrétion de peptides amyloïdes, à l'aide de cultures primaires de neurones issues de souris KI ApoE3 et ApoE4.

Pour répondre à ces objectifs, j'ai donc dans un premier temps, étudié l'interaction entre des peptides dérivés de la séquence de l'Aβ et des liposomes chargés en cholestérol par résonance de plasmon de surface.

Dans un deuxième temps, des mutants du site de liaison du cholestérol de l'APP ont été produits par mutagenèse dirigée puis ont été exprimés transitoirement dans des cellules

HEK293T. J'ai mesuré les taux de peptides amyloïdes A β 40, A β 42 et A β >28 sécrétés par ces cellules dans le but d'analyser les tailles de peptides sécrétés. Afin de voir si nous avons des différences d'activité des sécrétases, j'ai également analysé la production des produits de clivages des mutants de l'APP.

Dans un troisième temps, j'ai étudié la localisation subcellulaire de ces mutants par microscopie confocale.

Enfin, j'ai mis au point des cultures primaires de neurones corticaux prélevés sur des embryons de souris knocked in chez lesquelles le gène ApoE murin a été remplacé par le gène orthologue humain sous deux formes ApoE3 et ApoE4. J'ai donc mesuré sur ces cultures les taux de peptides amyloïdes A β 38, A β 40 et A β 42 sécrétés. Les taux d'ApoE et la phosphorylation de la protéine tau ont été analysés par western blot.

Matériels et Méthodes

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Plasmide et Réactifs

Plasmide

Le plasmide APP751 nous a été généreusement fourni par le Dr. Frédéric Checler (IPMC, France). Le plasmide APP-mCherry a été construit par insertion de la séquence codant l'APP751 entre les sites de restriction *AgeI* et *XmaI* dans le plasmide pmCherry-N1 (Clontech) (Figure 25). Ce plasmide possède un promoteur CMV et présente un gène de résistance à la kanamycine.

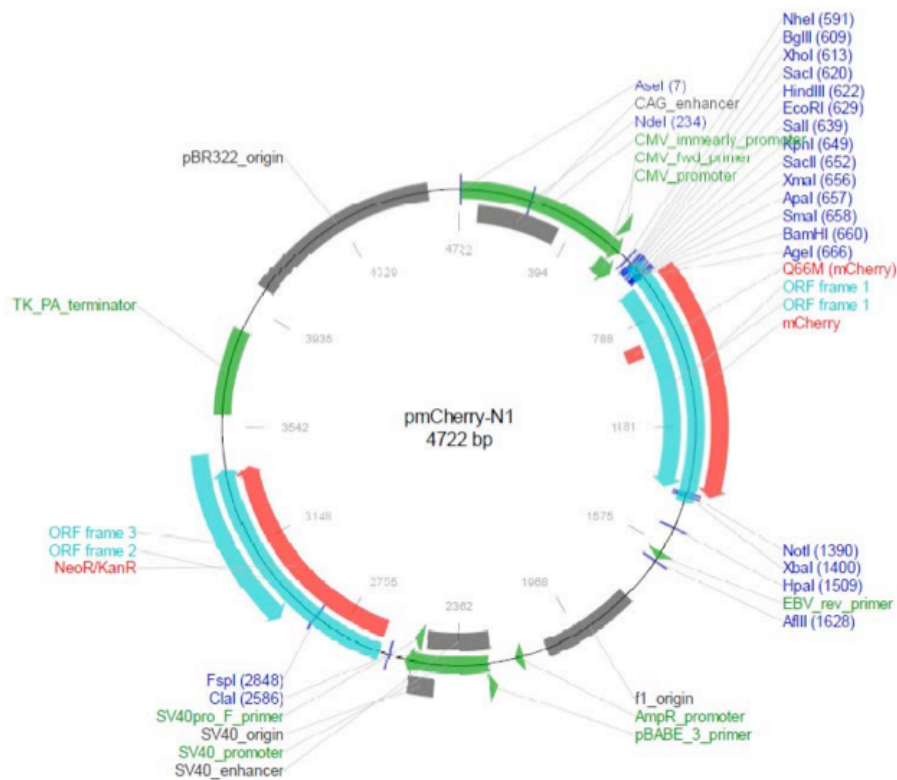


Figure 25 : Carte plasmidique du plasmide pmChery-N1 (Clontech).

Mutagenèse dirigée

Les plasmides codant pour la protéine de fusion APP-mCherry, ont subi des mutations ponctuelles simples (E22K, S26A, K28A, K28E, G29A, G33A, V39A) ou doubles (S26K28/AA, G29G33/AA) à l'aide du kit QuickChange II Site directed mutagenesis (Agilent) selon le protocole du fournisseur. La technique consiste à dénaturer les plasmides pour pouvoir y insérer les primers contenant la mutation désirée. L'ADN polymérase Pfu Turbo va permettre l'élongation des brins par PCR (95°C pendant 30 secondes puis 16 cycles : 30 sec 95°C/ 55°C 1min/ 68°C 6 min). L'ADN parental méthylé est ensuite éliminé par l'action d'une DNase DpnI.

Mutation désirée	Oligonucléotides	Température de fusion
E22K		70 °C
Sens	5' GGTGTTCTTTGCAAAAGATGTGGGTCAAAC 3'	
Anti sens	5' GTTTGAACCCACATCTTTTGCAAAGAACACC 5'	
S26A		80 °C
Sens	5' GCAGAAGATGTGGGTGCAAACAAAGGTGCAATCATTGG 3'	
Anti sens	5' CCAATGATTGCACCTTTGTTTGACCCACATCTTCTGC 3'	
K28A		79 °C
Sens	5' GAAGATGTGGGTCAAACGCAGGTGCAATCATTGGACTC 3'	
Anti sens	5' GAGTCCAATGATTGCACCTGCGTTTGAACCCACATCTTC 3'	
K28E		79 °C
Sens	5' GAAGATGTGGGTCAAACGAAGGTGCAATCATTGGAC 3'	
Anti sens	5' GTCCAATGATTGCACCTCGTTTGAACCCACATCTTC 3'	
G29A		72 °C
Sens	5' GGTCAAACAAAGCTGCAATCATTGGACTCA 3'	
Anti sens	5' TGAGTCCAATGATTGCACTTTGTTGAACC 3'	
G33A		72 °C
Sens	5' GTGCAATCATTGCACTCATGGTGGGC 3'	
Anti sens	5' GCCCACCATGAGTCAATGATTGCAC 3'	
V39A		73 °C
Sens	5' GGTGGGCGGTGCTGTCATAGCGAC 3'	
Anti sens	5' GTCGCTATGACAGCACCGCCACC 3'	
S26K28/AA		80 °C
Sens	5' GCAGAAGATGTGGGTGCAAACGCAGGTGCAATCATTGGACTC 3'	
Anti sens	5' GAGTCCAATGATTGCACCTGCGTTTGACCCACATCTTCTGC 3'	

Tableau 3: Liste des amorces utilisées pour introduire des mutations dans le plasmide APP751-mCherry. La double mutation G29G33/AA a été effectuée en deux temps en utilisant les amorces utilisées pour les simples mutations G29 et G33A.

Après transfection des plasmides, les bactéries compétentes XL1-Blue (*E.Coli*) (Invitrogen) transformées ont été sélectionnées sur boîtes de Pétri LB/ Agar contenant de la kanamycine (30 mg/ml) (Invitrogen).

Anticorps

Anticorps primaires	Fournisseur	Espèce	Dilution	Poids moléculaires (KDa)	Technique
EEA1	Cell signaling	lapin	1/500		Immunocytochimie
Phospho-tau AT8	Thermofisher	souris	1/1000	50-64	Western blot
Tau B19	Dr. Jean-Piere Brion	lapin	1/2500	50-64	Western blot
ApoE	Sigma Aldrich	lapin	1/2000	34	Western blot
Actine β	Sigma Aldrich	souris	1 /2000	42	Western blot
APP Cter C17	Dr. Nicolas Sergeant	lapin	1/2000	110-140	Western blot

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude.

Les anticorps anti-APP C-ter C17 et anti-tau (B19) nous ont généreusement été fournis par Nicolas Sergeant (Lille, France) et Jean-Pierre Brion (Belgique).

Anticorps secondaires	Fournisseur	Espèce	Dilution	Technique
Anti-lapin Alexa 488	Cell signaling	Chèvre	1/1000	Immunocytochimie
Anti-souris HRP	Invitrogen	Chèvre	1/2000	Western blot
Anti-lapin HRP	Invitrogen	Chèvre	1/2000	Western blot
Anti-souris	LI-COR	Chèvre	1/10000	Western blot Odysée
Anti-lapin	LI-COR	Chèvre	1/10000	Western blot Odysée

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires utilisés dans cette étude.

2.1.2 Les souris ApoE

Les souris ApoE Knock in sont des souris pour lesquelles le gène ApoE murin a été remplacé par son orthologue humain sous deux formes ApoE3 et ApoE4 (Taconic Biosciences, Danemark). Ce modèle murin a été créé en remplaçant l'allèle ApoE4 ou E3 murin par l'allèle

ApoE humain dans des cellules souches embryonnaires de souris E14Tg2a ES. Ces cellules ont été par la suite injectées dans des blastocytes. Les chimères obtenues ont été croisées avec des souris C57BL/6 pendant 7 générations (N7). Puis ces souris ont subi un dernier croisement (N8) et ont été maintenues à l'état homozygote (Knouff et al 1999).

2.2 Méthodes

2.2.1 Cultures cellulaires

2.2.1.1 Culture de cellules HEK293

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) ont été cultivées en milieu DMEM (Gibco) supplémenté par 10 % de sérum fœtal de veau (Invitrogen) et 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco) à 37°C et 5 % de CO₂. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits.

2.2.1.2 Transfection cellulaire et traitement

Les expériences de transfection ont été réalisées sur des cellules HEK 293T à 70 % de confluence dans du milieu OptiMEM (Gibco) sans antibiotique à l'aide de la lipofectamine 2000 (Invitrogen). 0,7 µg de plasmide ont été dilués dans 100 µL de milieu OptiMEM (Gibco). En parallèle, 4µL de lipofectamine 2000 (Invitrogen) ont été mélangés à 100 µL de milieu OptiMEM. La transfection a été réalisée selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). Après dépôt du mixe de transfection, les cellules ont été placées 4 heures dans l'incubateur à 37 °C, lavées avec du PBS 1X pour enlever toute trace d'agent transfectant, puis mises en présence de milieu complet : milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco).

Traitement au DAPT

Dans le but d'analyser le clivage des mutants du SLC par les sécrétases, les cellules ont subi 24 heures plus tard un traitement de 16 heures au N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) (Sigma Aldrich) dilué à une concentration de 5 µM dans le milieu complet neuf.

Traitement à la méthyl-β-cyclodextrine (MBCD)

Les cellules HEK293T transfectées avec les mutants de l'APP, ont été traitées 24 heures après transfection à la MBCD à 10mM pendant 30 minutes. Les cellules ont subi après le traitement 3 lavages au PBS-1X (Sigma Aldrich) puis ont été incubées à 37°C et 5 % de CO₂, dans du milieu DMEM seul (Gibco) pendant 8 heures. Par la suite, les cellules ont été lysées dans un tapon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl à pH 8.0, 150 mM de chlorure de sodium, 1.0% NP-40, 0.5% de deoxycholate de sodium, et 0.1% dodécylsulfate de sodium) (Sigma Aldrich) en présence d'inhibiteur de protéases (Complete Mini, Roche). Les surnageants et les lysats cellulaires sont conservés à -80°C.

Extraction des radeaux lipidiques

Les cellules HEK293T ont été ensemencées dans 6 puits d'une plaque de 12 puits, puis ont été transfectées 24 heures plus tard avec l'APPwt et l'APP K28A. Les cellules d'un puits ont été lysées dans 400 µl de tampon MBS constitué de MES monohydrate à 25 mM (Sigma Aldrich), de NaCl à 150 mM (Sigma Aldrich), d'inhibiteur de protéase (Complete Mini, Roche), de phenylmethanesulfonyl fluoride PMSF (Sigma Aldrich) à 100 µl (Sigma Aldrich) et de 1,4-Dithiothreitol DTT dilué au 1/1000^{ème} (Sigma Aldrich). Chaque homogenat est transféré dans le puits suivant afin de récupérer la totalité des cellules contenue dans les 6 puits dans un volume de 400µl. Les homogénats cellulaires (concentrés à 3µg/µl) sont incubés à 4°C, pendant 30 minutes avec une solution de détergeant (Brij58 à 1% et PMSF dilué au 1/1000^{ème}). Par la suite les homogénats ont été mélangés avec une solution de 400µl de sucrose à 80%. Les homogenats ont ensuite été déposés au fond de tubes à ultracentrifugation (Beckmann) puis un gradient de sucrose est effectué en déposant : 1,8 ml de sucrose 30% ; 1,2ml de sucrose 5% puis 7ml de tampon MBS. Les tubes ont ensuite été soumis pendant 17 heures à une ultracentrifugation à 4°C et 210 053g (rotor Beckmann SW45Ti). Au total 11 fractions de 400µl ont été prélevées puis soumises à un western blot et à un dosage de cholestérol selon le protocole du fournisseur (kit amplex red cholestérol, Sigma Aldrich).

2.2.1.3 Culture primaire de neurones corticaux P0

Les cultures primaires de neurones corticaux ont été préparées à partir de cerveaux de souris P0-P1 ApoE3 et ApoE4. Après avoir enlevé les méninges, les structures corticales ont été récupérées dans du milieu L15 (Invitrogen) et incubées dans la trypsine/EDTA 0,05%

(Gibco) pendant 8 minutes à 37°C. Les structures ont été dissociées par trituration mécanique dans : du milieu Neurobasal (sans glutamine, Gibco) auquel on ajoute : 2 % de B27 (Gibco), 1% de N2-supplement (Thermofisher scientific), 1 % de Glutamax (Gibco) et 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco), ainsi que de la DNase I (10 000U/ml, Serlabo) et 30% de sérum de veau fœtal. La suspension cellulaire a ensuite subi deux séries de décantation sur glace pendant 5 minutes. À suite de chacune de décantations les surnageants ont été récupérés et les structures ont été dissociées par trituration mécanique. La suspension cellulaire a été ensuite centrifugée 5 minutes à 152g, à 4°C. Les neurones ont étéensemencés dans des plaques de 6 puits pré-coatés avec la poly-D-lysine (0,1mg/ml, Sigma Aldrich) et cultivés à 37°C et 5 % de CO2 en milieu neuronal complet. Le milieu est changé de moitié au bout de 7 jours de culture (DIV7).

2.2.2 Dosage des produits de clivage de l'APP

Les dosages des peptides amyloïdes ont été effectués par deux kits différents à partir des surnageants de cellules HEK293T 24 heures après transfection avec les mutants APP-mCherry. Le kit MesoScale Discovery permet de mesurer les peptides amyloïdes Aβ38, 40 et 42. Le kit ELISA IBL permet de mesurer les formes plus courtes d'Aβ (entre 28 et 42 acides aminés) (Figure 26) et présente une méthode de détection différente de celle du kit MSD (Figure 26 et Tableau 6).

	MSD			ELISA IBL		
	Aβ38	Aβ40	Aβ42	Aβ28	Aβ40	Aβ42
Sensibilité (pg/ml)	9.97	16.7	0.36	3.55	3.55	3.55
Pmol/L	2.4	3.85	0.079	1.09	0.82	0.79
Anticorps de capture	Anticorps C-ter de l'Aβ monoclonal de souris			Anti-Aβ humain 82E1N-ter monoclonal de souris		
Anticorps de détection	6E10 N-ter anti-Aβ humain(1-16) monoclonal de souris			Anti-Aβ humain 11-28 HRP monoclonal		

Tableau 6. Comparaison de la sensibilité et de la détection des kits de dosage MSD et IBL.

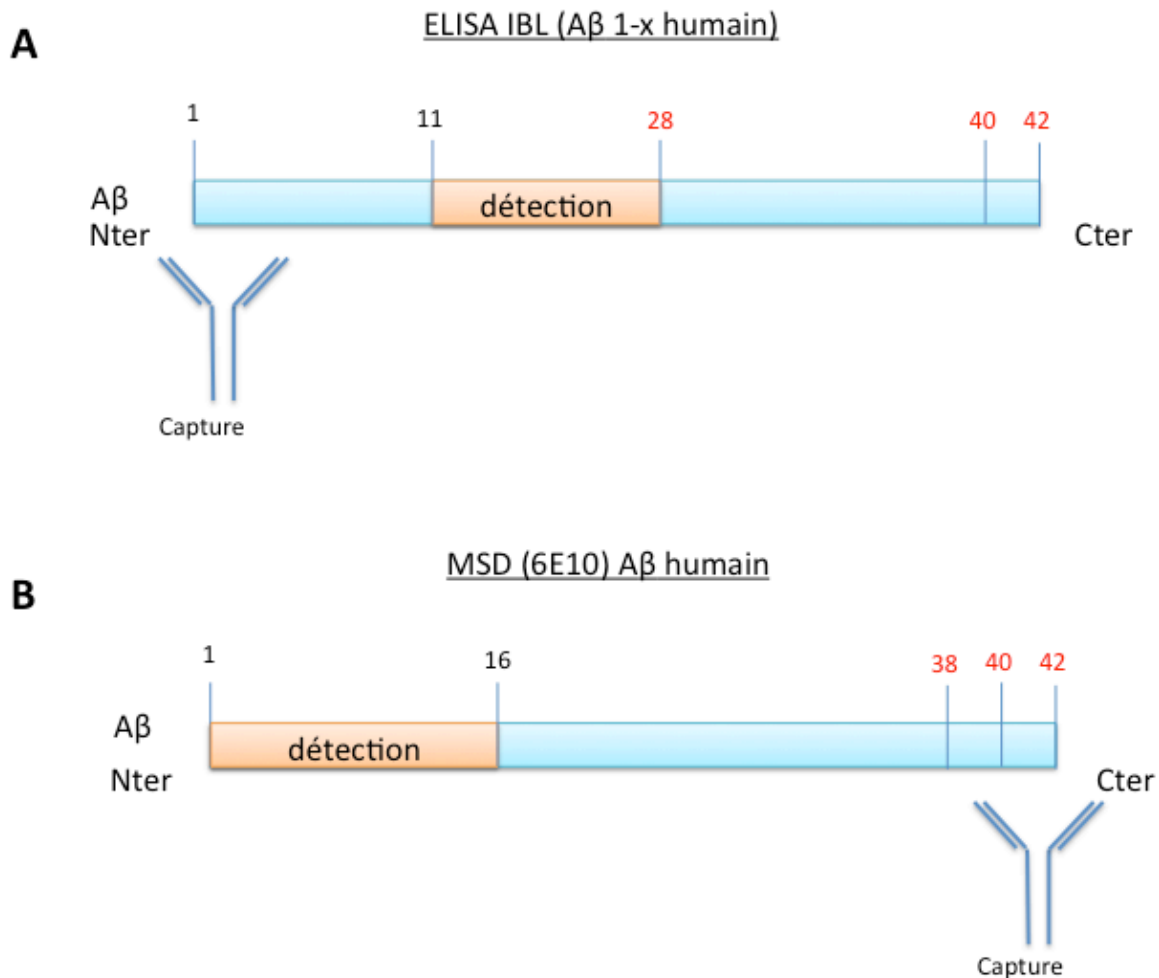


Figure 26 : Représentation schématique de la détection et de la capture des anticorps anti-A β des kits IBL et MSD.

A : Le kit IBL permet de mesurer les peptides A β 28, 40 et 42 à l'aide de l'anticorps de détection qui reconnaît l'épitope 11-28 de l'A β humain. La capture se fait en N-terminal par un anticorps anti-A β humain 82^{E1}. **B** : Le kit MesoScale Discovery (MSD) nous permet de mesurer les peptides A β 38, 40 et 42 à l'aide de l'anticorps de détection 6^{E10} qui reconnaît la partie N-terminal de l'A β (épitope 1-16). En revanche la capture se fait en C-terminal par un anticorps spécifique des formes 38,40 et 42.

2.2.2.1 Dosage des peptides A β 38, 40 et 42

Les surnageant des cellules HEK293T ont été récupérés 24 heures après la transfection, sur glace dans des tubes de polypropylène (VWR), contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Sigma). Les surnageants ont été ensuite conservés à -80°C. La concentration des peptides A β 38, 40 et 42 a été mesurée par un dosage immunologique via électrochimiluminescence (ECLIA) en multiplexe. Les dosages ont été effectués selon les instructions du fabricant. Brièvement, les échantillons ont été analysés à l'aide du MesoScale

Discovery (MSD) MESO QuickPlex SQ120. Les échantillons ont été déposés dans des plaques en carbone de 96 puits, contenant quatre points de capture : un point bloqué avec la BSA (contrôle de la courbe standard) et trois autres points revêtus d'anticorps spécifiques pour les trois isoformes A β 38, 40 et 42. 150 μ l d'une solution de tampon de blocage a été ajoutée dans les puits afin d'éviter des liaisons non spécifiques. Les plaques ont ensuite été scellées et incubées à température ambiante sous agitation pendant une heure. Les puits ont été par la suite lavés 3 fois avec un tampon de lavage. 25 μ l d'échantillons et de peptides synthétiques A β 38, 40 et 42 (correspondant à la gamme étalon) ont été déposés dans les puits, suivi de 25 μ l d'anticorps de détection anti-A β : 6E10 pour les surnageants de cellules HEK293T et 4G8 pour les surnageants de neurones ApoE. L'anticorps 6E10 reconnaît l'épitope 1-16 du peptide humain alors que l'anticorps 4G8 reconnaît l'épitope 17-24 des peptides A β humain et de rongeurs (Figure 27). Les plaques ont été scellées et incubées à température ambiante deux heures sous agitation. Les plaques ont ensuite été aspirées et lavées trois fois, puis un tampon de lecture a été déposé juste avant l'analyse des plaques sur le MSD QuickPlex SQ120 Imager. Un courant électrique passe à travers une microélectrode contenue dans chaque puits produisant une réaction d'oxydoréduction du cation Ru²⁺, émettant une lumière rouge à 620nm. La concentration de chaque isoforme d'A β a été mesurée en pg/ml pour chaque échantillon en utilisant les courbes standard des gammes. Les données ont ensuite été normalisées par la concentration protéique des échantillons mesurée par dosage Bradford (Bradford).

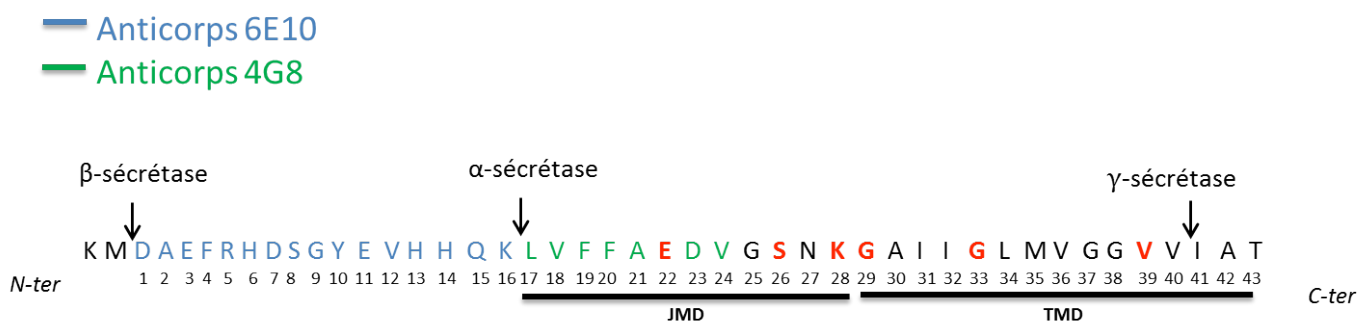


Figure 27 : Représentation schématique des sites de reconnaissances des anticorps 6E10 et 4G8.

La séquence de l'A β est représentée en noir. L'anticorps 6E10 reconnaît l'épitope 1-16 de l'A β humain. L'anticorps 4G8 reconnaît l'épitope 17-24 des peptides A β humains et de rongeurs. Les acides aminés mutés par mutagenèse dirigée sont indiqués en rouge.

2.2.2.2 Dosage des peptides A β (1-x)

Les surnageants des cellules HEK293T ont été récupérés 24 heures après transfection, sur glace dans des tubes de polypropylène (VWR), contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche). Les surnageants ont été ensuite conservés à -80°C. Les concentrations des peptides A β 28, 40 et 42 ont été mesurées par un dosage immuno-enzymatique (ELISA) à l'aide du kit IBL A β (1-x). Les dosages ont été effectués selon les instructions du fabricant. Les échantillons ont été déposés dans des plaques 96 puits, contenant les anticorps spécifiques pour l'A β . Brièvement, 100 μ l d'échantillon, d'anticorps anti-A β et de peptides synthétiques A β 40 (servant à la gamme étalon) ont été déposés dans des plaques 96 puits. Les plaques ont été scellées et incubées toute la nuit à 4°C sous agitation douce. Après plusieurs lavages des plaques (minimum 7), 100 μ l de solution d'anticorps anti-A β couplé à la peroxydase de raifort (HRP) reconnaissant l'épitope 11-28 du peptide A β humain ont été déposés dans les puits. Les plaques ont ensuite été scellées et incubées une heure à 4°C sous agitation douce. Les plaques ont été ensuite rincées 9 fois avec un tampon de lavage. 100 μ L d'une solution contenant un agent colorimétrique, ont été déposés dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, une solution d'arrêt a été déposée. L'absorbance a été mesurée à 450 nm (Thermo multiskanEX) dans les 30 minutes suivant le dépôt de la solution d'arrêt. La concentration de chaque isoforme d'A β a été mesurée en pg/ml pour chaque échantillon en utilisant les courbes standard des gammes. Les données ont ensuite été normalisées par la concentration protéique des échantillons mesurée par dosage Bradford (Bradford).

2.2.2.3 Dosages des fragments solubles sAPP α et sAPP β

Les surnageants des cellules HEK293T ont été récupérés 16 heures après le traitement au DAPT (soit environ 40 heures après transfection) sur glace dans des tubes de polypropylène (VWR), contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche). Les surnageants sont ensuite conservés à -80°C. Les concentrations des peptides sAPP α et sAPP β ont été mesurées par un dosage immunologique par électrochimiluminescence (ECLIA) en multiplexe. Les dosages ont été effectués selon les instructions du fabricant. Nous procédons de la même manière que pour les dosages A β 38, 40 et 42. Les échantillons ont été déposés

dans des plaques en carbone de 96 puits, contenant quatre points de capture : deux points bloqués avec la BSA (contrôle de la courbe standard) et deux autres points d'anticorps spécifiques pour les peptides sAPP α et sAPP β . Dans un premier temps, les échantillons et les peptides synthétiques sAPP α et sAPP β (correspondant à la gamme étalon) ont été déposés dans les puits sous agitation pendant une heure. Dans un second temps, l'anticorps de détection anti-APP a été déposé et incubé à température ambiante une heure sous agitation. Les plaques ont été ensuite aspirées et lavées trois fois, puis incubées 10 minutes à température ambiante avec 100 μ l de tampon de lecture. Les fragments solubles sAPP α et sAPP β ont été mesurés en ng/ml. Les données ont été ensuite normalisées par le taux de transfection correspondant à la somme des densités optiques des bandes APP-mCherry et CTFs-mCherry (ImageJ).

2.2.3 Extraction protéique et western blot

Les cellules HEK293T ont été rincées au PBS 1X, puis lysées sur glace à l'aide d'un tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl à pH 8.0, 150 mM de chlorure de sodium, 1.0% NP-40, 0.5% de deoxycholate de sodium, et 0.1% dodécylsulfate de sodium) (Sigma Aldrich), auquel a été ajouté du Phenylmethylsulfonyl fluoride 100X (Sigma Aldrich) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche). Les lysats ont été soniqués 3 fois pendant 5 min puis conservés à -80°C. Les lysats de culture de neurones ont été traités de la même manière, avec l'ajout d'un cocktail d'inhibiteur de phosphatase (Complete Mini, Roche). La concentration protéique des lysats a été quantifiée par dosage Bradford (Biorad) selon le protocole du fabricant.

Les westerns blot ont été réalisés à partir des lysats cellulaires de cellules HEK293T traitées au DAPT et des lysats de cultures neuronales ApoE. Les protéines des lysats de cultures HEK293T ont été séparées dans des gels de polyacrylamide 16.5% Tris-Tricine (Biorad) pour les expériences de traitement au DAPT et 4-20% Tris-glycine pour l'analyse de l'expression de protéines intracellulaires sur les lysats de neurones ApoE. Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (Biorad) à 150V pendant trois heures à 4°C. Après saturation au lait 10%, les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines APP, actine β , tau, phospho-tau, et ApoE dilués dans une solution de BSA-azide 2%. Les membranes ont été incubées avec les

anticorps secondaires fluorescents respectifs (dilués dans une solution de TBS-tween 0.05%) pendant 1heure sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière. La révélation et quantification de la fluorescence ont été réalisées par le logiciel d'analyse (Set up ImageStudio CLx) de l'Odysée (Odysée Clx LI-COR). La révélation et quantification de la fluorescence ont été réalisées par le logiciel d'analyse de l'Odysée.

2.2.4 Immunocytochimie et microscopie confocale

Immunocytochimie

Les cellules HEK293T cultivées sur des lamelles en verre coatées à la poly-D-lysine (0,1mg/ml, Sigma Aldrich), ont été fixées pendant 15 minutes au paraformaldéhyde 4% (Electron microscopy Sciences), 24heures après leur transfection. La réaction de fixation a été arrêtée par l'incubation des cellules en présence d'une solution de chlorure d'ammonium (à 50 mM), à température ambiante pendant 10 minutes. Les cellules ont été perméabilisées en présence d'une solution de Triton à 0,2% pendant 8 minutes. Afin de saturer tous les sites de liaisons non spécifiques, les cellules ont été incubées en présence d'une solution de PBS-BSA 3% sous agitation pendant 1 heure et à l'obscurité. Les cellules ont été ensuite incubées 1 heure à température ambiante et sous agitation, avec un anticorps anti-EEA1 dilué au 1/500^{ème} dans une solution de PBS-BSA 3%. 3 lavages au PBS 1X ont été réalisés, puis les cellules ont été incubées 1heure avec un anticorps secondaire alexa-488 (dilué au 1/1000^{ème}) sous agitation. Les lamelles ont été ensuite montées sur lame dans du milieu de montage FluoroMount (SouthernBiotech). Après polymérisation pendant une nuit à l'obscurité et à température ambiante, les lames sont conservées à 4°C.

Microscopie confocale et analyse d'images

Des images sous formes de stacks cellulaires ont été obtenues au microscopie confocal droit Olympus FV-1000. La fluorescence a été mesurée avec un objectif à immersion à huile 60x (ouverture numérique de 1.35). Les stacks cellulaires ont été réalisés avec un z=0,24µm. Le nombre et la taille des endosomes ont été analysés par le avec le logiciel ICY à l'aide du plugin spot detector (<http://www.bioimageanalysis.org/>).

La colocalisation du signal mCherry et du signal Alexa 488 est analysée par le pluggin Jacop d'imageJ. Le pluggin permet de calculer un coefficient de corrélation r : le coefficient de

Pearson. Pour chaque cellule delimitée par une zone d'intérêt, un pourcentage de colocalisation est déterminé à partir du coefficient de corrélation r.

2.2.5 Etude de l'interaction des peptides et des liposomes chargés en cholestérol par résonance de plasmon de surface (RPS)

2.2.5.1 Production des liposomes

Une solution de 200 µl de dioleoylphosphatidylcholine et de cholestérol (SIGMA Aldrich) à 1mg/ml a été préparée dans du chloroforme. Les liposomes ont été chargés à 40% de cholestérol. Après évaporation de la solution dans un flacon en verre, 1ml de PBS 1X a été ajouté. La solution a été vortexée puis placée dans un bain à sonication pendant 5 min. La solution a ensuite été passée dans un appareil à extruder contenant des membranes permettant l'obtention de liposomes avec un diamètre compris entre 200 et 250 nm (Aventi Polar lipids). Les liposomes ont été ensuite conservés à 4°C.

2.2.5.2 Production des peptides

Des peptides wild-type et mutant dérivés de la séquence d'Aβ ont été synthétisés. Les séquences des peptides correspondent au site de liaison du cholestérol de l'APP et présentent une cystéine en C-terminal permettant une fixation directe sur la lame d'or :

Peptide wild-type : HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVAC

Peptide muté : HQKLVSSAEDVGN~~DK~~GAIIGLMVAC

Les peptides ont été solubilisés dans un mélange eau-acétonitrile (50%) et conservés à -80°C.

2.2.5.3 Résonance de plasmon de surface

La mesure de l'interaction entre les peptides et les liposomes chargés en cholestérol se fait par résonance de plasmon de surface. Les lames d'or (Schott) ont été nettoyées au plasma Cleener pendant 10 minutes et incubées dans de l'eau distillée pendant 2heures. Les solutions de peptides sont composées de 2,5µl de peptides à une concentration de 5µM, 1,5µl de betaine (Sigma Aldrich) et 1µl d'eau-acétonitrile (50%). La solution de référence (contrôle négatif) est composée de 1,5µl de betaine et 3,5µl d'eau. Les peptides ont été spottés sur les

lames à l'aide du spotteur (Horiba Scientific). Les lames ont ensuite été placées à 4°C pendant 1 heure. Le système microfluidique a été rincé préalablement au dodécylsulfate de sodium à 0,5% (Sigma Aldrich), à l'eau puis au PBS 1X (Sigma Aldrich) 15 minutes avant le début de l'expérience. La lame a été déposée sur un prisme de borosilicate NSF10 (Laser Components SAS).

Un faisceau lumineux est appliqué au prisme et sera réfléchi selon un certain angle et à longueur d'onde précise (Figure 28).

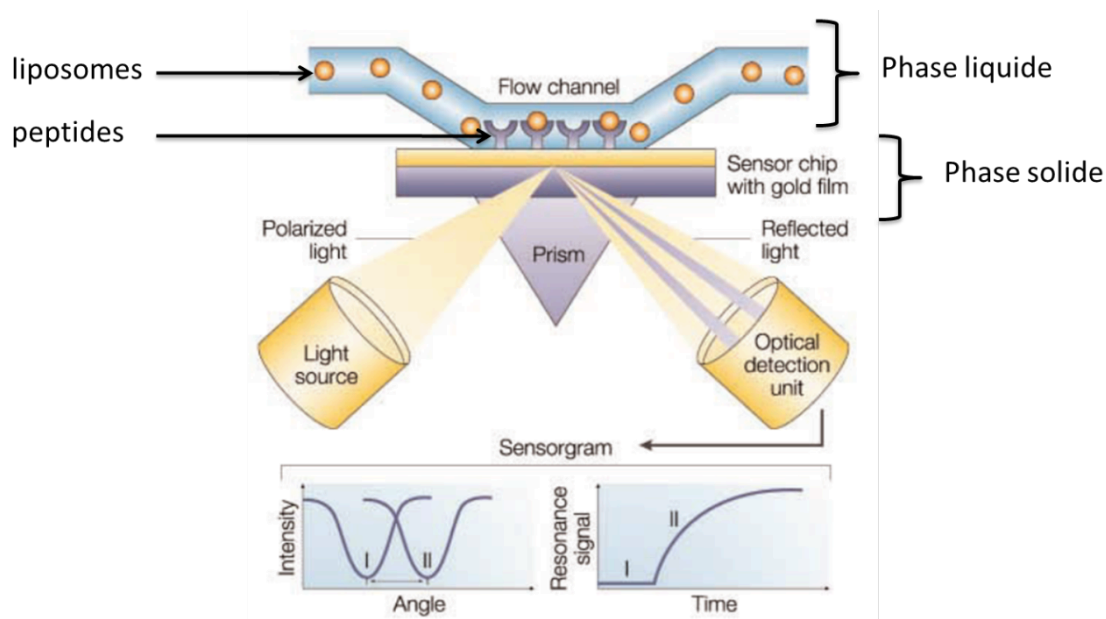


Figure 28 : La résonance de plasmon de surface (RPS). Les peptides sont spottés directement sur la lame d'or (fixée à un prisme) à l'aide du spotteur (phase solide). Par la suite, des liposomes en solution sont injectés dans le système microrfluidique (phase liquide). La réflexion de la lumière polarisée permet de déterminer une variation de réflectivité correspondant au signal d'interaction (Cooper 2002).

Le signal mesuré correspond à une variation de l'intensité réfléchie induite par la modification de la condition de résonance lors de l'adsorption des biomolécules (liposomes) à la surface de la biopuce. Cette variation de réflectivité correspond au signal d'interaction entre les peptides et les liposomes chargés en cholestérol. L'angle de fonctionnement optimal choisi pour nos expériences est de 39.5° et la longueur d'onde choisie est de 730 nm.

2.2.6 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph-Pad Prism (version 6.05). Les résultats sont affichés en calculant la moyenne (+/- SEM). Chaque mutant est

comparé à l'APPWT en utilisant le test T Student. Lorsque le nombre d'échantillon est trop petit, un test Mann-Whitney a été effectué.

Résultats

3 Résultats

3.1 Validation du site de liaison du cholestérol sur l'APP par résonance de plasmon de surface

Le site de liaison du cholestérol a fait l'objet de plusieurs études basées sur l'utilisation de la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Beel et al. 2008; Barrett et al. 2012). Ces études sont basées uniquement sur des analyses structurales, j'ai donc voulu me rapprocher des conditions physiologiques et développer une méthode qui permet d'étudier la liaison de l'APP avec le cholestérol (contenu dans une membrane) : la résonance de plasmon de surface (RPS). Cette technique permet de mesurer l'interaction entre différentes molécules, l'une contenue dans une phase solide et l'autre dans une phase liquide (Figure 29). Dans notre cas l'APP est représenté par des peptides de 25 acides aminés (phase solide) (Figure 30), et le cholestérol par des liposomes chargés en cholestérol (phase liquide). Les liposomes nous permettent de mimer les conditions physiologiques du cholestérol dans une membrane plasmique.

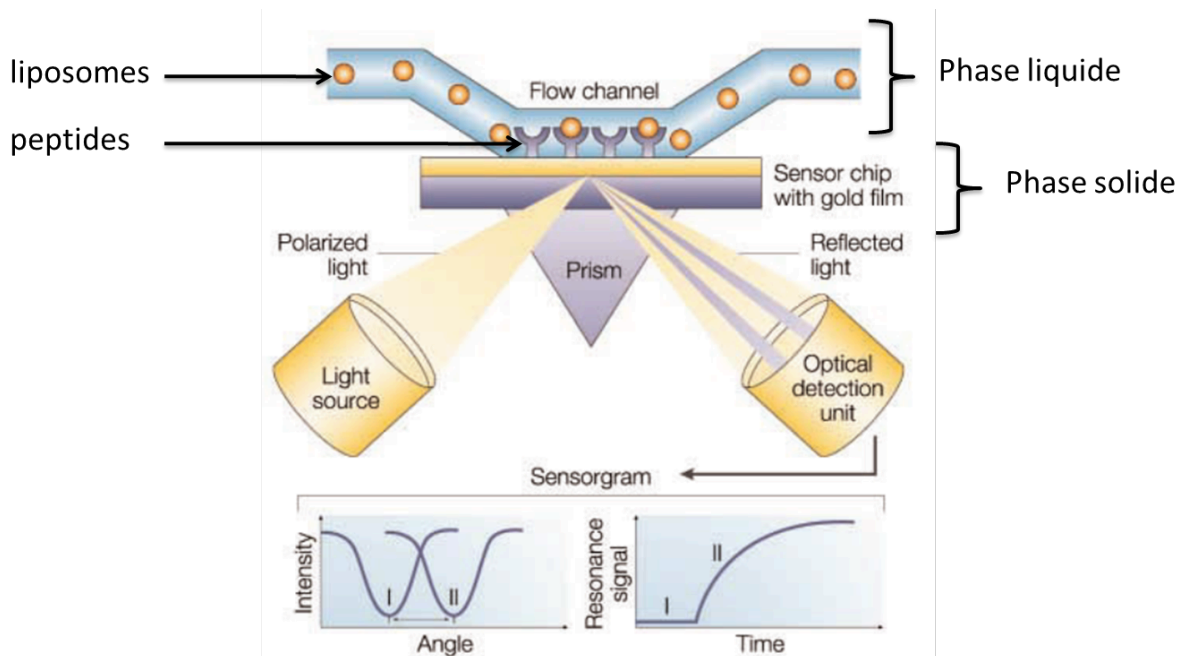


Figure 29 : La résonance de plasmon de surface (RPS).

La RPS permet de mesurer l'interaction entre des molécules fixées sur un support (phase solide) et des molécules en solution (phase liquide) (Cooper 2002).

La résonance de plasmon correspond à la vibration collective des électrons à la surface de l'or. Une lumière polarisée est appliquée sur le prisme (sur lequel repose une lame d'or), puis est réfléchiée selon un angle et une longueur d'onde donnée. Le signal mesuré correspond à une variation de l'intensité réfléchiée induite par la modification de la condition de résonance lors de l'adsorption des biomolécules à la surface de l'or. L'étude du SLC pouvait être réalisée de deux manières : soit les peptides sont fixés sur la lame d'or et les liposomes sont en solution, ou bien au contraire les liposomes sont fixés sur la lame d'or et les peptides sont injectés en solution. Cette technique est très similaire à celle du Biacore et son avantage repose sur le fait que nous pouvons déposer jusqu'à 100 sondes différentes sur la même lame. Il nous a donc paru plus judicieux d'opter pour la première possibilité, à savoir fixer les peptides sur la lame et injecter les liposomes en solution. Ces mesures de RPS ont été réalisées à l'Institut d'Optique à Saclay en collaboration avec Julien Moreau et Michael Canva. L'équipe de Michael Canva, spécialisée dans cette technique a beaucoup travaillé sur l'hybridation de fragments d'ADN dans le but de détecter des mutations (Duval et al. 2009; Hottin et al. 2012).

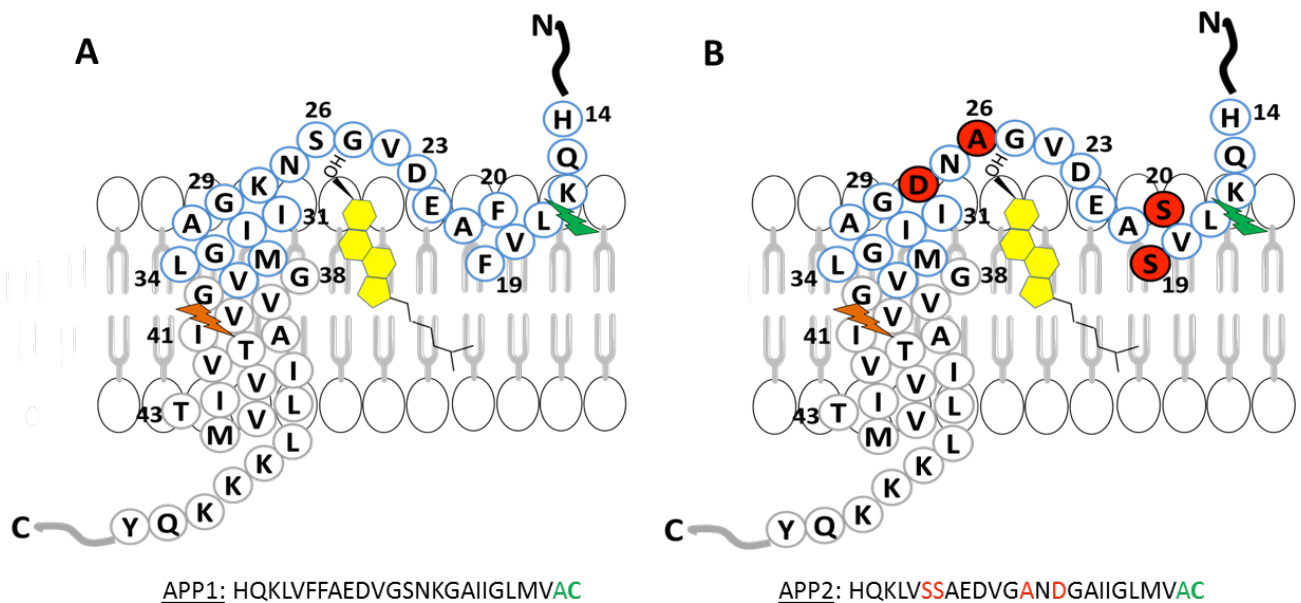


Figure 30 : Séquence des peptides dérivés de la séquence de l'APP.

A : La séquence du peptide APP1 représentée en bleu correspond à la séquence 14-36 de l'A β wild-type. En vert et orange sont représentés les sites de clivage de l' α et la γ -sécrétase respectivement. **B :** En bleu est représentée la séquence de l'APP2 muté. Le peptide APP2 présente 4 mutations au niveau du site de liaison du cholestérol : F19S, F20S, S26A et K28D (résidus déterminés par une étude de modélisation moléculaire réalisée par Catherine Marquer et Nicolas Gilles, en se basant sur l'étude RMN de Barrett et al., 2012). La séquence de l'APP2 a été déterminée de façon à cibler les acides aminés susceptibles d'être en forte interaction avec le cholestérol. Une cystéine (en vert) permettant la fixation directe sur l'or, est ajoutée à l'extrémité C-terminale des peptides wild-type (APP1) et mutant (APP2).

Les peptides APP1 et APP2 thiolés sont spottés directement sur une lame d'or, puis la lame est saturée à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin. Par la suite des liposomes chargés en cholestérol (constitués de dioleoylphosphatidylcholine et de 40% de cholestérol) préparés au laboratoire, sont injectés dans le système et nous obtenons un signal de réflectivité correspondant au signal d'interaction (Figure 31).

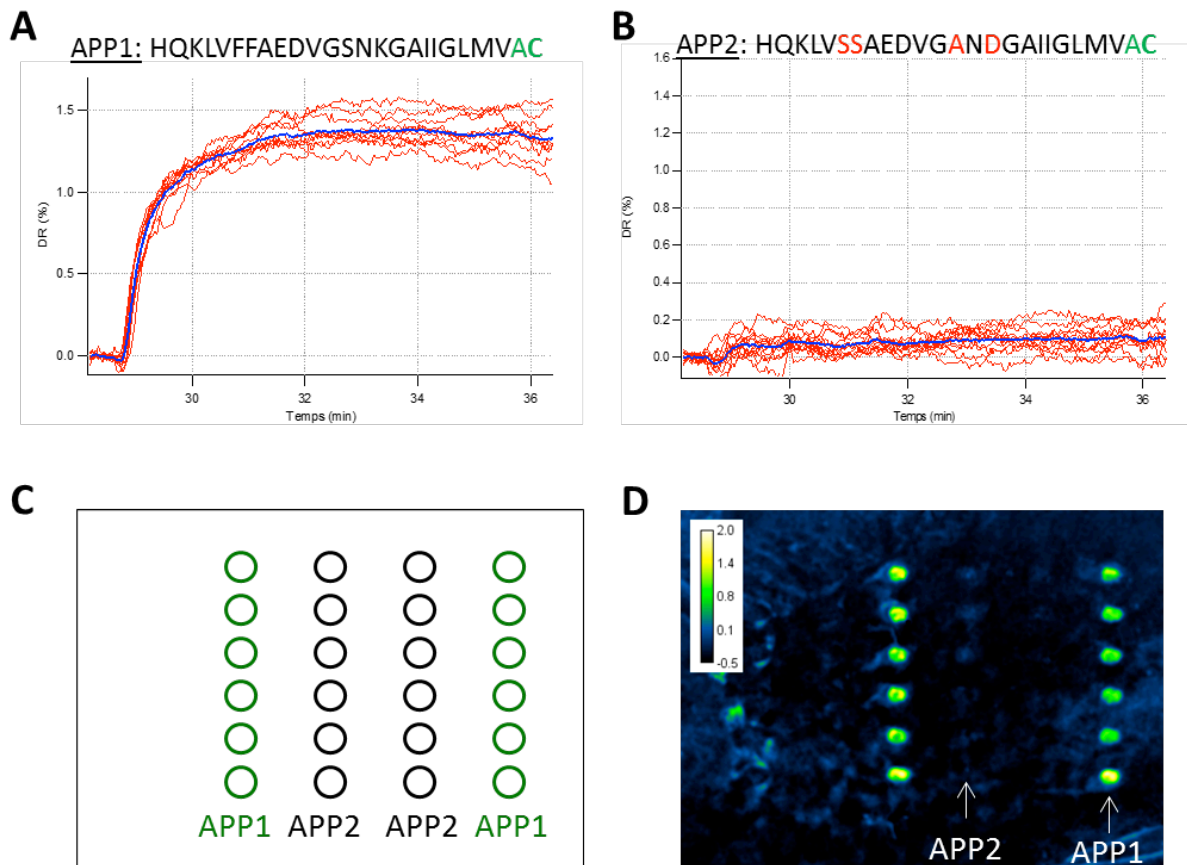


Figure 31 : Mesure de la variation du signal de réflectivité correspondant à l'interaction entre les peptides et les liposomes chargés à 40% de cholestérol. **A** : Variation du signal de réflectivité (en pourcent) de l'APP1 après injection des liposomes. **B** : Variation du signal de réflectivité (en pourcent) de l'APP2 muté au niveau du SLC. Les peptides sont spottés à une concentration de 5 μ M. **C** : Plan du dépôt de peptides avec en vert les peptides APP1 (WT) et en noir les peptides APP2 (mutés). **D** : Image correspondant à la variation de réflectivité mesurée en A et B, les peptides étant spottés suivant le plan de dépôt décrit en C.

D'après la figure 31A, la variation du signal de réflectivité atteint 1,5% lorsque les peptides APP1 sont en contact avec les liposomes : il y a donc une interaction entre l'APP et les liposomes chargés en cholestérol. Cette interaction est similaire à celle obtenue dans les travaux de Hottin et al. (Hottin et al. 2007). En revanche le signal d'interaction entre l'APP2

et les liposomes est non détectable (Figure 31B). Le signal observé en vert (Figure 31D) montre la présence d'une interaction entre les peptides wild-type APP1 et les liposomes chargés en cholestérol. Par contre, on n'observe aucun signal entre les peptides APP2 et les liposomes, ce qui confirme l'absence d'interaction mesurée en B entre les peptides APP2 et les liposomes chargés en cholestérol. Le SLC de l'APP prédit d'après les expériences de RMN est donc confirmé par notre expérience de RPS. Nous pouvons donc conclure que ces mutations du SLC abolissent complètement l'interaction du cholestérol avec les peptides.

Nous avons procédé à la synthèse de peptides contenant les mutations simples F19S, F20S et K28D afin de connaître l'effet individuel de chaque mutation sur l'interaction avec les liposomes chargés en cholestérol. Nous avons spotté tous les peptides ainsi que les premiers peptides APP1 et APP2 sur une même lame, et analysé l'interaction après passage des liposomes chargés en cholestérol. Malheureusement les résultats n'étaient pas interprétables et reproductibles pour l'APP1 et APP2. Les peptides ne sont pas stables dans le temps et la fixation directe de ces peptides sur l'or favorise certainement leur agrégation engendrant une perte de leur capacité à se lier aux liposomes. En effet, cette expérience a été reproduite 2 fois mais en déposant uniquement une goutte de chaque peptide à la pipette directement sur la lame d'or.

Une nouvelle synthèse de peptides a été réalisée avec plusieurs modifications permettant d'améliorer la stabilité des peptides et leur fixation sur la lame d'or (en collaboration avec Nicolas GILLES et Gilles MOURIER-CEA de Saclay) (Figure 32). APP9 et APP10 ont des séquences APP respectivement similaires aux APP1 et APP2.

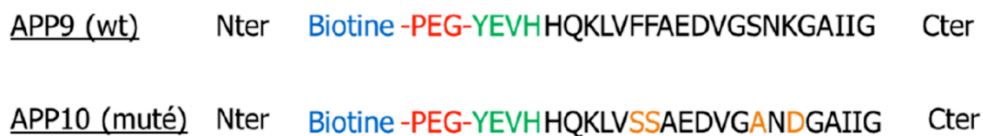


Figure 32 : Séquences des peptides wt APP9 et muté APP10 biotinylés. Les nouvelles séquences des peptides wt APP9 et muté APP10 présentent une biotine en N-terminale (en bleu) et un spacer de polyéthylène-glycol (en rouge), avec suppression de la cystéine en C-terminale. En noir l'ancienne séquence APP1 et APP2. Les mutations de l'APP10 (en orange) sont identiques à celles présentes dans l'APP2.

Sur ces nouvelles synthèses la partie C-terminale de la séquence des peptides APP1 et APP2 a été raccourcie, (plus de méthionine pour éviter l'oxydation du peptide et également une

suppression de la cystéine qui servait à la fixation directe sur l'or). Nous avons allongé les séquences peptidiques en N-terminal, permettant de garder la tyrosine en amont pour faciliter le dosage de ces peptides après leur synthèse (en vert). L'ajout de la séquence de polyéthylène-glycol permet d'augmenter la distance entre le peptide et la lame d'or, et d'augmenter la solubilité du peptide (PEG en rouge). Enfin, l'ajout d'une biotine en N-terminale permet une fixation sur la chimie de surface cystéamine-neutravidine couramment utilisée à l'Institut d'Optique (en bleu). Pour le moment, des mises au point restent encore à effectuer avec ces peptides et la chimie de surface.

3.2 Production de mutants APP dans le site de liaison du cholestérol (SLC)

Des études par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont permis d'identifier un site de liaison directe entre C99, protéine résultant du clivage de l'APP par Bace1, et le cholbimalt (un analogue du cholestérol) (Beel et al. 2008; Barrett et al. 2012). À partir de ces deux études, j'ai donc généré des mutations simples et doubles par mutagenèse dirigée sur l'APP751-mCherry en ciblant les acides aminés décrits comme étant indispensables pour l'interaction avec le cholestérol (figure 33A). Au total, j'ai généré 7 simples mutations et deux doubles mutations (flèches rose et bleu, figure 33B). J'ai décidé de réaliser des inversions de charges au niveau juxtamembranaire (E22K et K28E, en rose foncé figure 33B) et une suppression de charge (K28A, en rose pâle figure 33B). En mutant les deux glycines transmembranaires et la sérine juxtamembranaire (G29A, G33A, S26A en vert, figure 33B) j'ai procédé à une augmentation de l'hydrophobicité. À l'inverse, la mutation de la valine V39A transmembranaire induit une diminution de l'hydrophobicité (en vert pâle, figure 33B). Parmi les mutations effectuées seule la mutation E22K correspond à une mutation de la forme familiale de la MA : la mutation italienne. J'ai par la suite procédé à la transfection de ces plasmides dans des bactéries compétentes, puis à la purification de l'ADN plasmidique. Les plasmides ont été séquencés afin de sélectionner les clones positifs pour les mutations. J'ai ensuite procédé à la purification des ADN plasmidiques et à leur amplification par Maxiprep. Ces étapes m'ont permis d'obtenir un stock d'ADN plasmidique qui m'a servi pour toutes les expériences.

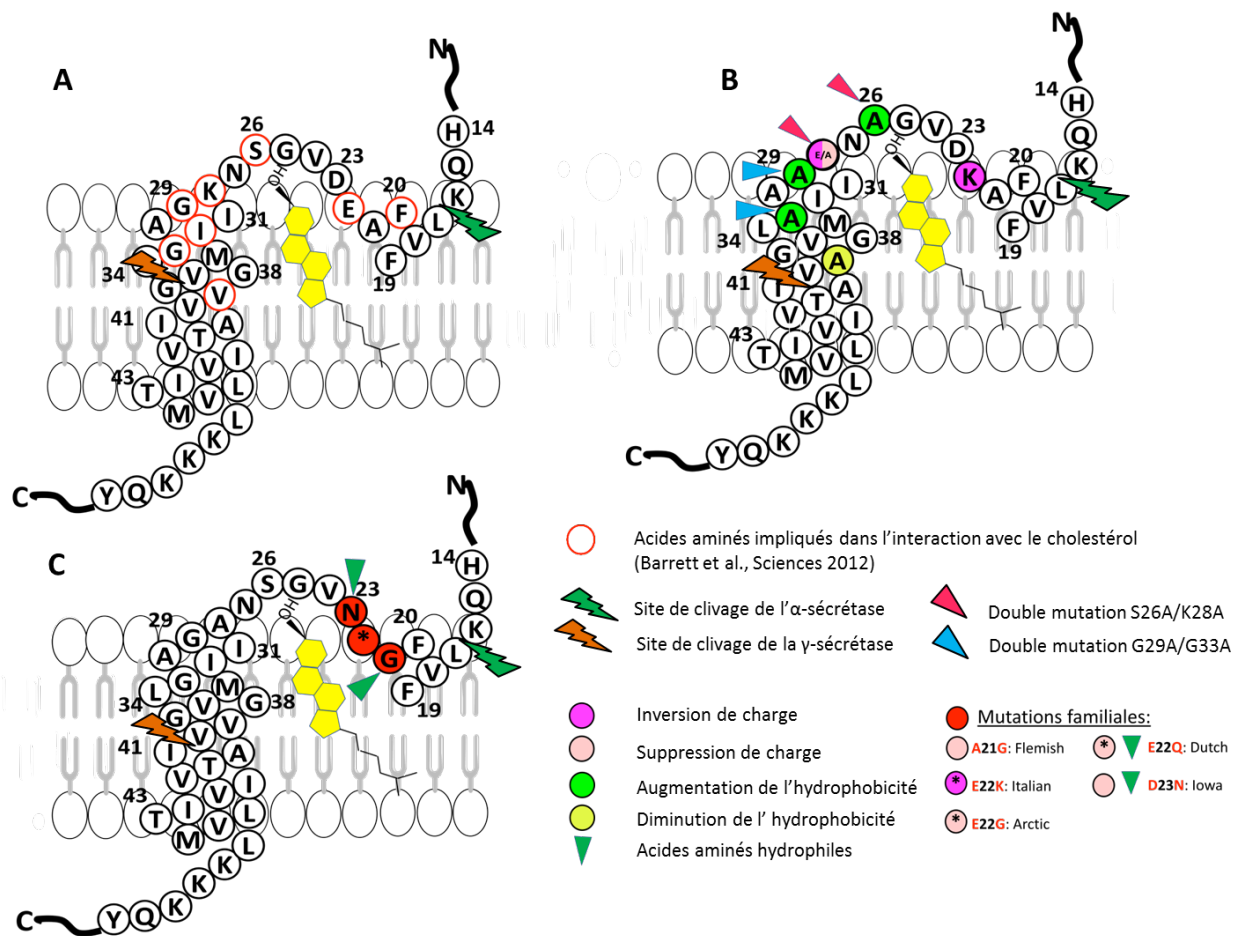


Figure 33 : Les mutations dans le SLC.

A : Les acides aminés dont la mutation en alanine inhibent l'interaction de C99 avec le cholestérol sont entourés en rouge (Beel et al 2008, Barrett et al 2012). Le cholestérol et les sites de clivage de l' α et la γ -sécrétase sont indiqués en jaune, vert et orange respectivement. B : Les mutations que j'ai effectuées sont indiquées en vert et rose. C : Les mutations familiales présentes dans le SLC sont indiquées en rouge. La mutation italienne E22K correspond à une mutation que j'ai effectuée en B.

Ces mutants générés vont nous permettre d'étudier par la suite dans des cellules HEK293T l'influence du SLC sur le clivage de l'APP par les sécrétases et la production de peptides amyloïdes (Figure 34).

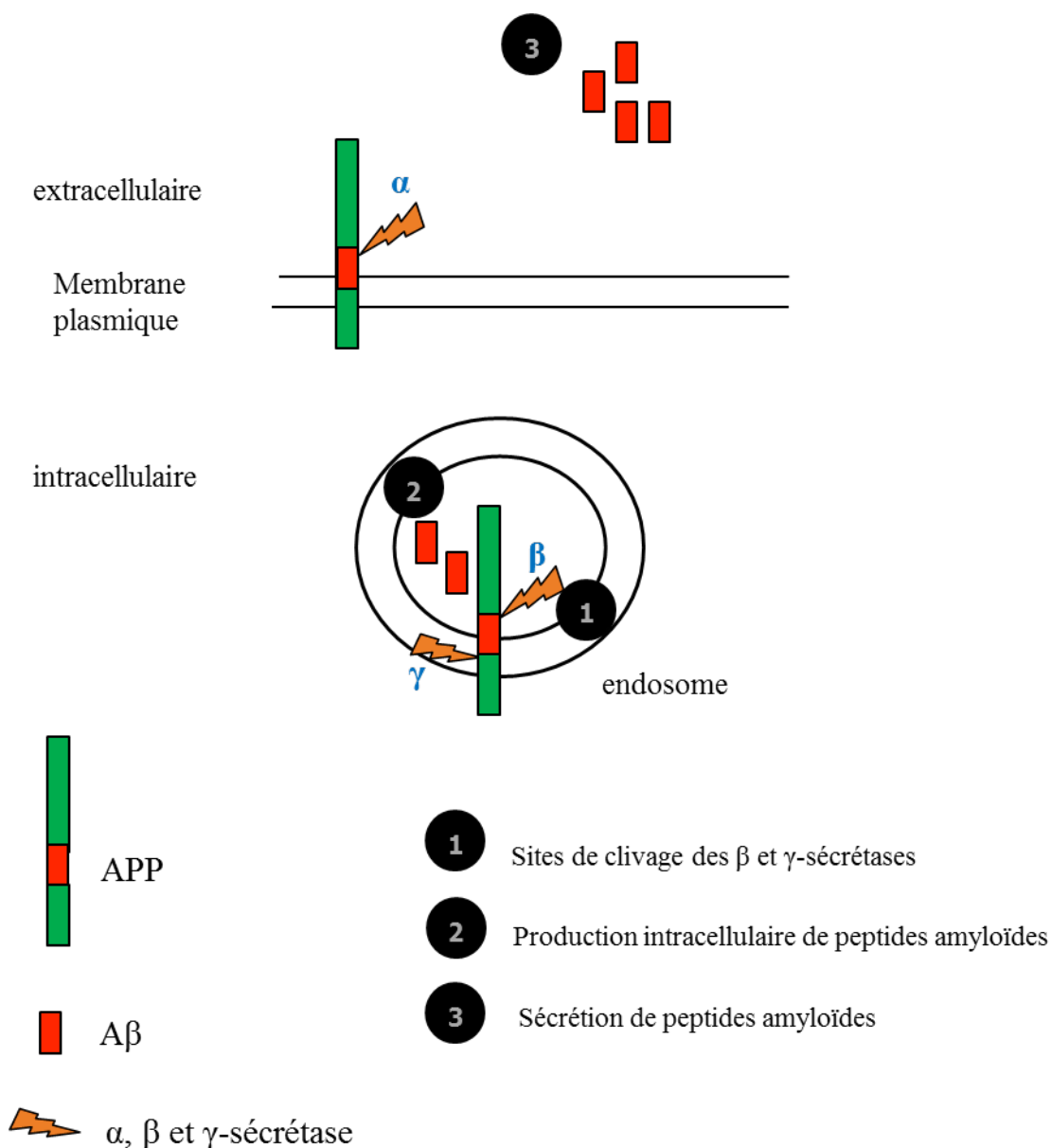


Figure 34 : Représentation schématique de l'étude du SLC en trois étapes.

L'APP est représenté en vert (avec l'Aβ en rouge) dans un endosome et les sécrétases (α, β et γ) en bleu. L'APP transmembranaire est endocyté et clivé dans les endosomes où le pH acide est favorable à l'activité de la β-sécrétase. L'APP est clivé majoritairement par l'α-sécrétase à la membrane plasmique.

3.2.1 Effets des mutations dans le SLC sur le clivage de l'APP

3.2.1.1 Sécrétion de peptides amyloïdes

Afin d'étudier les effets des mutants du SLC sur la sécrétion de peptides amyloïdes, j'ai transfecté les cellules HEK293T avec les plasmides exprimant les différents mutants (Figure 33B). Les mesures d'Aβ secrété (40 et 42) sont effectuées 24h après la transfection, par ELISA avec le MesoScale Discovery (MSD) à l'aide de l'anticorps de détection 6E10 qui permet de détecter l'Aβ humain

(Figure 36). Nous avons choisi cet anticorps car une des mutations (la mutation familiale E22K) se trouve sur le site de reconnaissance de l'anticorps 4G8 (Figure 35). Les taux d'A β 38, en dessous de la limite de détection, n'ont pas pu être déterminés.

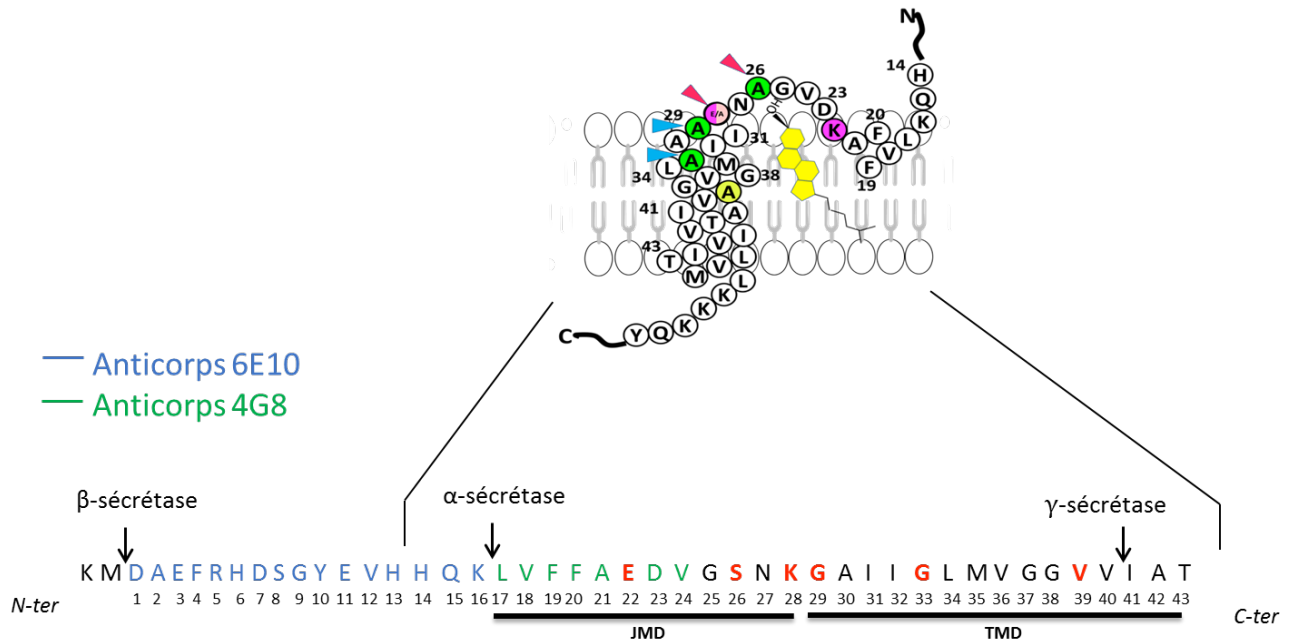


Figure 35 : Représentation schématique des sites de reconnaissances des anticorps 4G8 (en vert) et 6E10 (en bleu) (partie du bas). Les mutations effectuées sur l'APP sont indiquées en rouge. JMD : domaine juxtamembranaire, TMD : domaine transmembranaire.

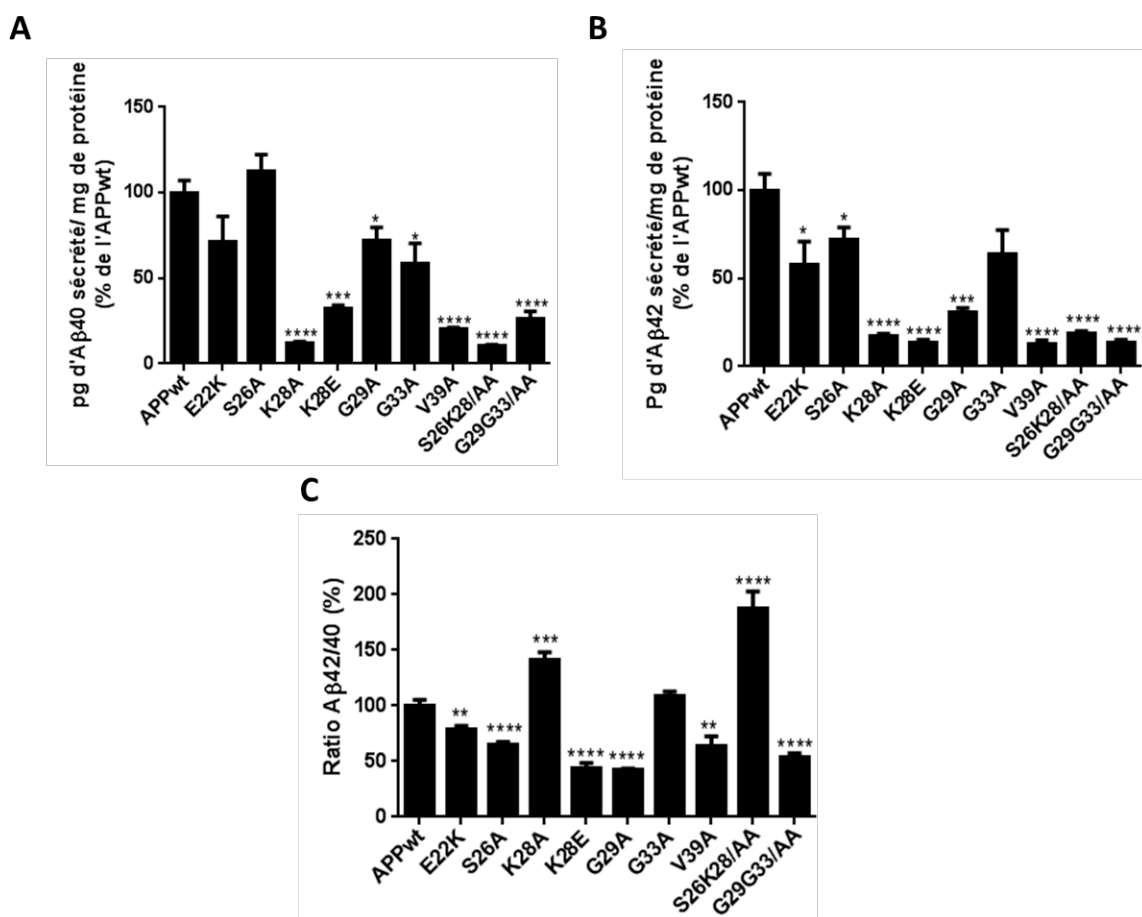


Figure 36 : Modulation de la sécrétion d'Aβ40 et 42 par les mutants du SLC de l'APP dans les HEK293T transfectées.

A, B : Dosage MSD des taux d'Aβ40 et 42 extracellulaires respectivement sur des HEK293T transfectées avec les différents mutants du SLC de l'APP. Les résultats sont normalisés avec la quantité de protéines intracellulaires déterminée par dosage Bradford et représentés en pourcentage d'Aβ produit par l'APPwt (t test, moyenne +/- SEM, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, **** : p<0,0001, comparaison avec l'APPwt, 3 expériences indépendantes avec 6<n<8). **C** : Ratio d'Aβ42/40 en pourcentage. Numérotation selon l'Aβ.

Toutes les mutations diminuent significativement et fortement les taux d'Aβ40 extracellulaires, excepté les mutants E22K et S26A.

Les mutations juxtamembranaires S26K28/AA (double mutant), K28A et K28E diminuent très fortement les taux d'Aβ40 extracellulaires avec en moyenne 89%, 88% et 68% de diminution d'Aβ40 sécrété respectivement (Figure 36A, table 1 en annexe). Les mutations transmembranaires V39A et G29G33/AA entraînent également une importante diminution des taux d'Aβ40 sécrétés de 80% et 74% respectivement. Les mutations simples transmembranaires G29A et G33A, diminuent les taux d'Aβ40 mais de façon moins importante que les mutants cités précédemment avec 28 et 42% de diminution respectivement (Figure 36A, table 1).

Toutes les mutations diminuent considérablement les taux d'Aβ42 extracellulaires, particulièrement les mutants K28A, K28E, V39A, S26K28/AA et G29G33/AA avec une sécrétion diminuée en moyenne 85%. Cependant, cette diminution n'est pas significative pour le simple mutant G33A. Les mutations S26K28/AA, K28A et G29A diminuent de 80% et 83% la sécrétion d'Aβ42. De plus, les mutations E22K et S26A présentent 42% et 28% de diminution d'Aβ42 sécrété respectivement (Figure 36B, table 1).

La double mutation S26K28/AA engendre des taux d'Aβ40 et 42 similaires à la simple mutation K28A (environ 10,4% et 12,1% pour l'Aβ40 et 19% et 17,1% pour l'Aβ42 respectivement). La mutation K28A permet à elle seule d'obtenir des taux d'Aβ40 et 42 extracellulaires similaires à ceux des doubles mutations S26A/K28A. Ainsi, les effets observés par la double mutation S26K28/AA proviennent en réalité de la mutation K28A. La double mutation n'a pas d'effet additif sur la diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes.

Les simples mutations G29A et G33A produisent des taux d'Aβ40 extracellulaires nettement supérieurs à ceux de la double mutation G29G33/AA avec 72,3% et 58,4% contre 26,1% d'Aβ40 sécrété respectivement. De la même manière les mutations G29A et G33A produisent 30,6% et 63,8% d'Aβ42 contre 13,5% pour la double mutation G29G33/AA. Nous pouvons donc conclure que nous avons un effet cumulatif de ces deux simples mutations (G29A et G33A). Par ailleurs, on constate que la mutation simple G29A diminue l'Aβ42 de manière plus importante que la mutation G33A mais produit des taux d'Aβ40 extracellulaires plus élevés que la simple mutation G33A. Bien que ces deux glycines soient toutes les deux transmembranaires et soient mutées en alanine, l'une semble avoir un effet plus prononcé sur la diminution de la sécrétion de peptides Aβ42. La position dans la membrane de l'acide aminé muté joue donc un rôle important sur la sécrétion de peptides amyloïdes.

La figure 36C montre une diminution significative du ratio Aβ42/40 pour toutes les mutations excepté K28A, G33A et S26K28/AA. Les cellules HEK293T secrètent majoritairement l'Aβ40. Selon les mutations nous observons des effets différents sur la sécrétion de l'Aβ40 et l'Aβ42.

En conclusion, nous démontrons que les mutants du SLC de l'APP produisent de faibles quantités d'Aβ40 et 42 secrétés. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette diminution est due à une accumulation intracellulaire de peptides amyloïdes.

3.2.2 Production intracellulaire de peptides amyloïdes

Compte tenu des fortes diminutions de production d'Aβ40 et d'Aβ42 par les mutants nous avons voulu savoir si les peptides Aβ n'étaient pas séquestrés dans le cytoplasme. Nous avons donc réalisé des mesures par MSD des taux d'Aβ38, 40 et 42 intracellulaire produits par les mutants avec l'anticorps de détection 6E10. Les résultats sont représentés dans la figure 37 ci-dessous.

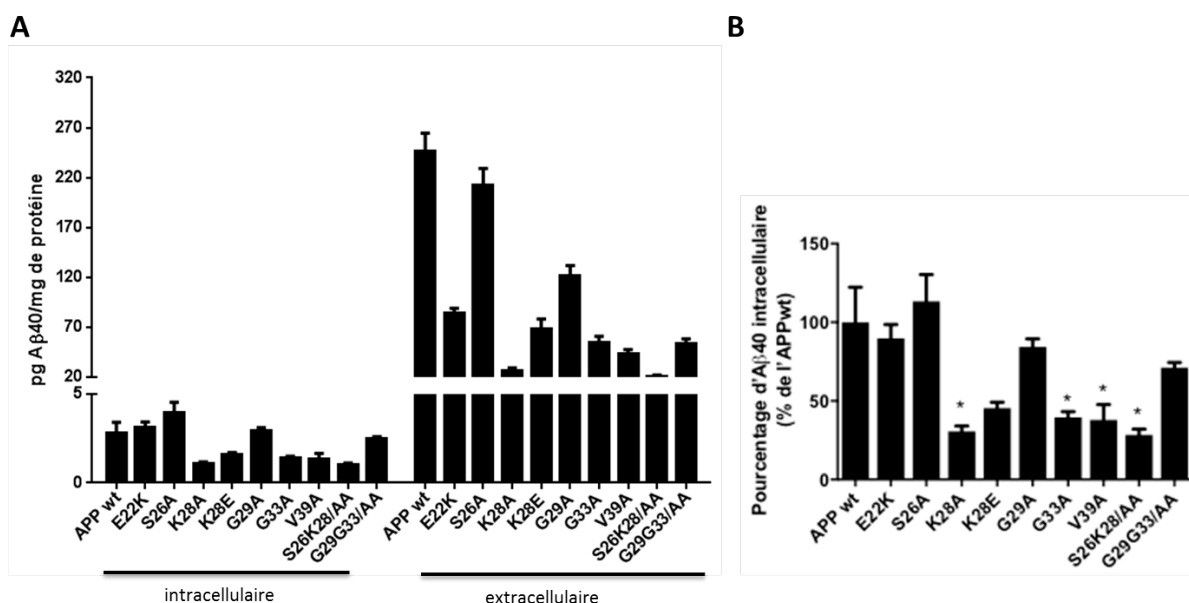


Figure 37 : Modulation de la production intracellulaire d'Aβ40 par les mutants du SLC de l'APP dans les HEK93T transfectées.

A : Dosage MSD des taux d'Aβ40 intracellulaires et extracellulaires sur une expérience. Les résultats sont normalisés avec la quantité de protéines intracellulaires déterminée par dosage Bradford. **B** : Dosage MSD des taux d'Aβ40 intracellulaires sur des HEK293T transfectées avec les différents mutants de l'APP. Les résultats sont normalisés avec la quantité de protéines intracellulaires déterminée par dosage Bradford et normalisés en pourcentage d'Aβ produit par les cellules transfectées avec l'APPwt (test Mann-Whitney, moyenne +/- SEM, * : $p < 0.05$, comparaison avec l'APPwt, $n = 3$ à 4 par condition sur une expérience). Numérotation selon l'Aβ.

Les taux d'Aβ38 et 42 intracellulaires étant en dessous du seuil de détection, ils n'ont pas pu être mesurés. De plus, les taux intracellulaires d'Aβ40 sont 20 à 50 fois moins élevés que les taux d'Aβ40 extracellulaires (Figure 37A, table 2). Les taux d'Aβ40 ont été mesurés par le MSD mais restent proches de la limite de détection aussi bien pour l'APPwt que pour les différents mutants (Figure 37B). Nous pouvons donc conclure que les diminutions d'Aβ40 et 42 sécrétés ne sont pas dues à une rétention intracellulaire des peptides amyloïdes. Cependant,

nous pouvons nous interroger sur la présence de peptides amyloïdes intracellulaires sous formes d'agrégats.

Pour conclure, nous avons montré que les mutations du SLC de l'APP entraînent de très importantes diminutions de sécrétion d'A β 40 et 42. Nous démontrons également, que les fortes diminutions d'A β 40 et 42 sécrétés ne sont pas dues à une accumulation intracellulaire d'A β . Ces diminutions pourraient donc résulter soit d'une diminution de la quantité d'A β globale sécrétée, soit d'une augmentation de la production de peptides plus courts. En effet, une étude s'est intéressée au mutant juxtamembranaire K28A et montre par analyse des peptides par spectrométrie de masse que cette mutation engendre une diminution des peptides 40 et 42 mais une augmentation des peptides de plus petites tailles A β 33 et A β 34, sans affecter le taux global d'A β sécrété (Kukar et al. 2011).

3.2.3 Sécrétion de peptides amyloïdes A β >28

Nous avons mesuré les taux d'A β (1-x) sur les mêmes surnageants utilisés pour les dosages MSD d'A β 38, 40 et 42 extracellulaires (Figure 36) à l'aide du kit ELISA IBL A β (1-x). Ce kit permet de mesurer les taux de peptides A β ayant une taille minimum de 28 acides aminés (Figure 38) que je nommerai A β >28, y compris les formes 40 et 42.

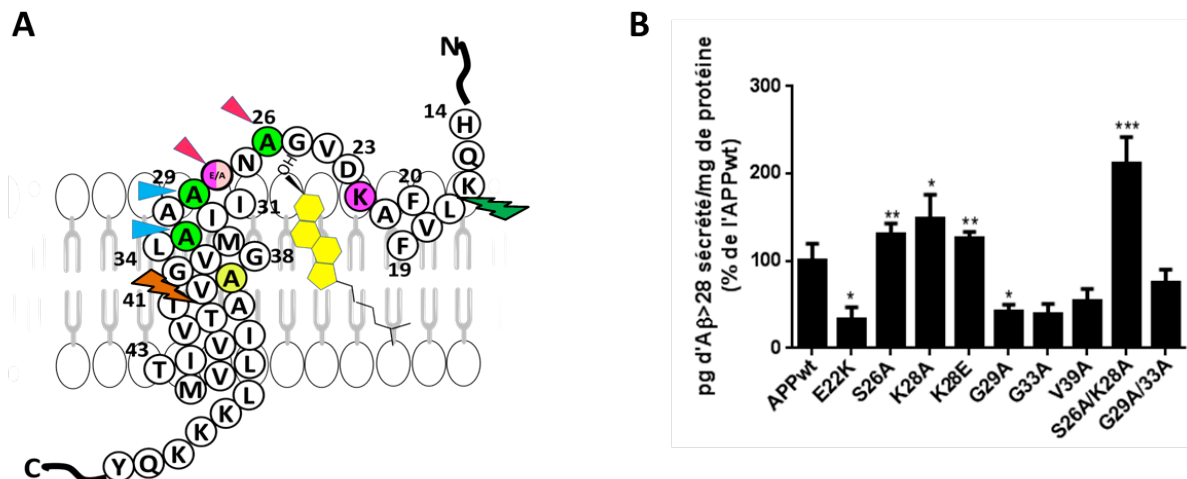


Figure 38 : Modulation de la sécrétion d'Aβ (1-x) par les mutants du SLC de l'APP dans les HEK93T transfectées.

A : Représentation schématique du SLC de l'APP. Les résidus colorés représentent les 7 mutations ponctuelles effectuées sur le SLC de l'APP. Les mutations engendrant une augmentation ou une diminution de l'hydrophobicité sont indiquées en vert foncé et vert clair respectivement. Les mutations impliquant une inversion ou une suppression de charge sont indiquées en rose foncé et rose clair respectivement. Les doubles mutations sont indiquées par les pointes de flèche rose et bleu. **B** : Dosage ELISA (kit IBL) des taux d'Aβ>28 extracellulaires sur des HEK293T transfectées avec les différents mutants de l'APP. Les résultats sont normalisés avec la quantité de protéines intracellulaires déterminée par dosage Bradford et normalisés en pourcentage d'Aβ produit par les cellules HEK293T transfectées avec l'APPwt. Numérotation selon l'Aβ (t test, moyenne +/-SEM, * : p<0.05, ** : p<0,01, *** : p<0,001, comparaison avec l'APPwt, 3 expériences indépendantes avec 6<n<8).

Les mutations juxtamembranaires S26A, K28A, K28E et S26K28/AA provoquent des augmentations significatives d'Aβ>28 sécrétés avec une augmentation allant de 30% à 111% (Figure 38B, table 3). À l'inverse, les mutations E22K et G29A diminuent significativement les taux d'Aβ>28 avec une diminution de 67% et 58% respectivement. Les mutations G33A, V39A et G29G33/AA diminuent également les taux d'Aβ sécrétés mais de façon non significative. Ces résultats mettent donc en lumière trois catégories de mutants qui ont des effets différents sur la sécrétion d'Aβ>28 :

- les mutations juxtamembranaires qui augmentent les taux d'Aβ>28 et diminuent les taux d'Aβ40 et 42 (excepté la S26A qui diminue uniquement l'Aβ42) : on a donc une augmentation des peptides courts d'Aβ.
- les mutations transmembranaires qui diminuent les taux d'Aβ>28 ainsi que les taux d'Aβ40 et 42
- la mutation familiale E22K qui tout en étant juxtamembranaire diminue également ces taux d'Aβ>28 et d'Aβ42 (Figure 39).

Mutants	Familiale	Juxtamembranaire	Transmembranaire	A β >28	A β 40	A β 42
E22K	✓	✓		↘	=	↘
S26A K28A K28E S26K28/AA		✓		↗	↘ *S26A	↘
G29A G33A V39A G29G33/AA			✓	↘	↘	↘ *G33A

Figure 39 : Classification des mutants du SLC en trois catégories selon la sécrétion de peptides amyloïdes. Les mutations sont regroupées en trois classes : mutation familiale, juxtamembranaire et transmembranaire. * S26A, *G33A : excepté le mutant S26A et G33A.

3.2.4 Analyse de la localisation subcellulaire des mutants du SLC de l'APP

Les faibles taux d'A β 40 et 42 sécrétés et l'absence d'accumulation intracellulaire d'A β pourraient indiquer une diminution du clivage des mutants du SLC par les sécrétases. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que cette diminution du clivage pourrait être due soit à une diminution de l'endocytose entraînant une accumulation de l'APP à la membrane plasmique ou à une diminution de la relocalisation des mutants du SLC dans les radeaux lipidiques entraînant une diminution de l'endocytose. Pour répondre à ces hypothèses j'ai transfecté les cellules HEK293T avec les mutants du SLC de l'APP et réalisé un marquage des endosomes précoces en utilisant un anticorps anti-EEA1. Dans un premier temps j'ai comparé le marquage mCherry de l'APPwt et des mutants à la membrane plasmique par microscopie confocale. Je n'ai pas constaté de marquage plus prononcé à la membrane plasmique pour les mutants du SLC. Le marquage observé est plutôt diffus à la membrane et majoritairement vésiculaire dans le cytoplasme des cellules (Figures 41 et 42). Puis dans un second temps, j'ai analysé l'endocytose des mutants du SLC en réalisant des stacks de ces cellules au microscope confocal afin d'étudier la colocalisation des mutants avec les endosomes précoces (Figure 40).

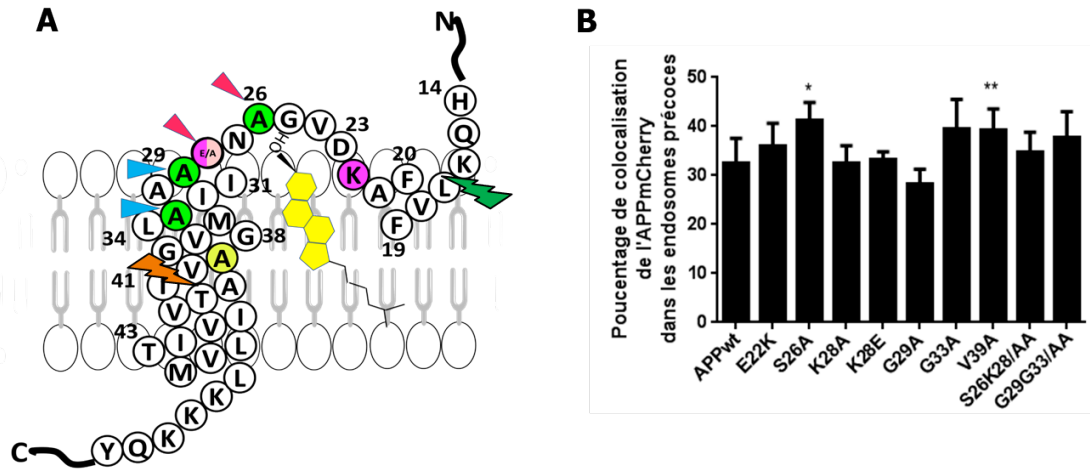


Figure 40 : Colocalisation du signal mCherry dans les endosomes précoces.

A : Représentation schématique du SLC de l'APP. Les résidus colorés représentent les 7 mutations ponctuelles effectuées sur le SLC de l'APP. Les mutations engendrant une augmentation ou une diminution de l'hydrophobicité sont indiquées en vert foncé et vert clair respectivement. Les mutations impliquant une inversion ou une suppression de charge sont indiquées en rose foncé et rose clair respectivement. Les doubles mutations sont indiquées par les pointes de flèche rose et bleu. **B** : Les cellules HEK293T transfectées avec les mutants du SLC ont subi un immunomarquage à l'aide de l'anticorps EEA1 (marqueur des endosomes précoces). La colocalisation du signal mCherry-Alexa488 a été quantifiée à partir de stacks réalisés sur ces cellules par microscopie confocale, à l'aide du plugin Jacop de ImageJ. Les résultats sont représentés en pourcentage de colocalisation moyen par cellule. Ce pourcentage est déterminé à partir du coefficient de Pearson (t test, moyenne +/- SEM, $7 < n < 10$ cellules sur une expérience). * : $p=0.0194$ pour S26A, ** : $p=0.0020$ pour V39A.

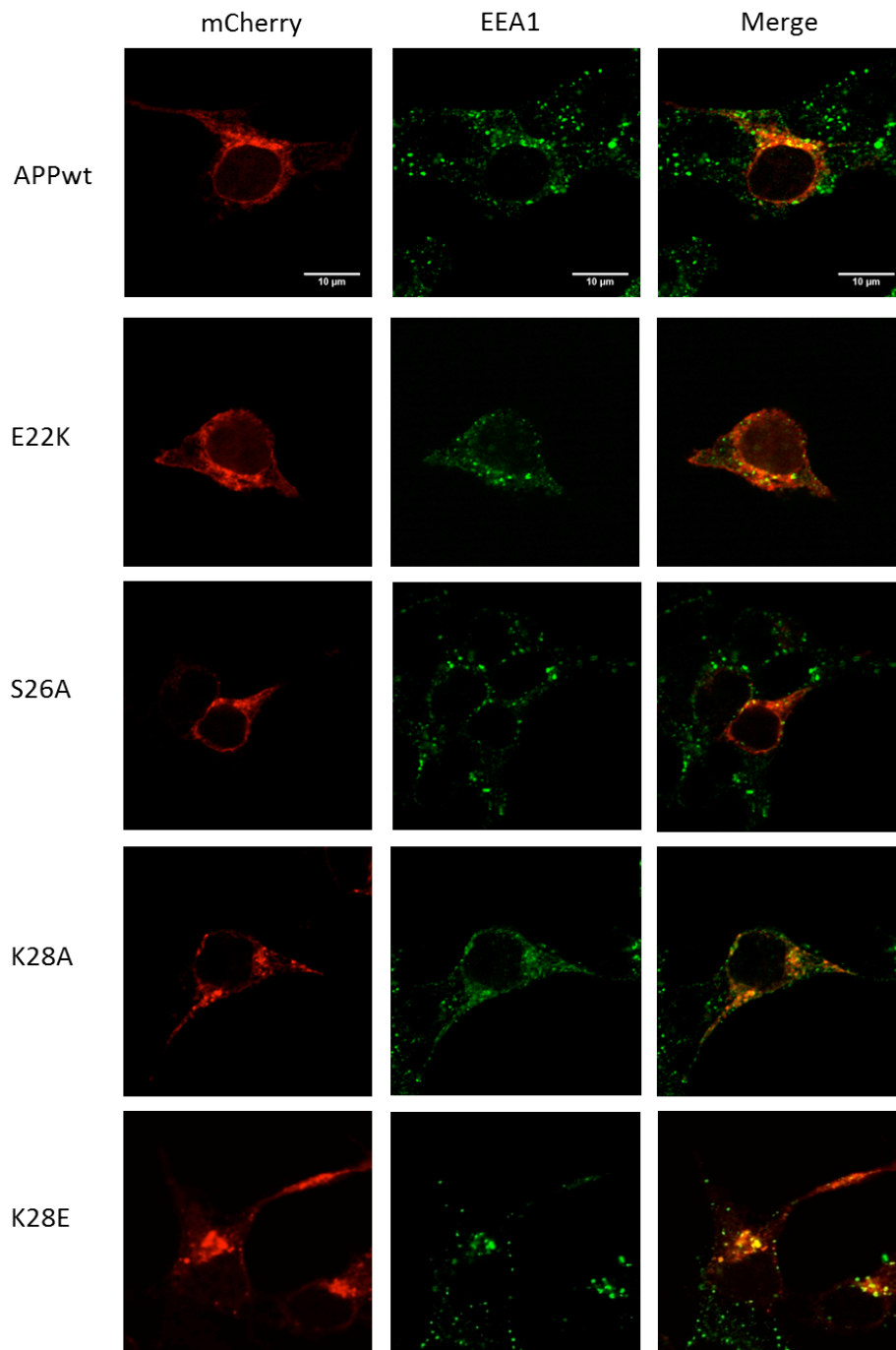


Figure 41 : Colocalisation des mutants du SLC dans les endosomes précoces.

Les cellules HEK293T transfectées avec les mutants E22K, S26A, K28A et K28E du SLC ont subi un immunomarquage à l'aide de l'anticorps EEA1 (marqueur des endosomes précoces, en vert). Les images ont été prises par microscopie confocale. Échelle 10µm.

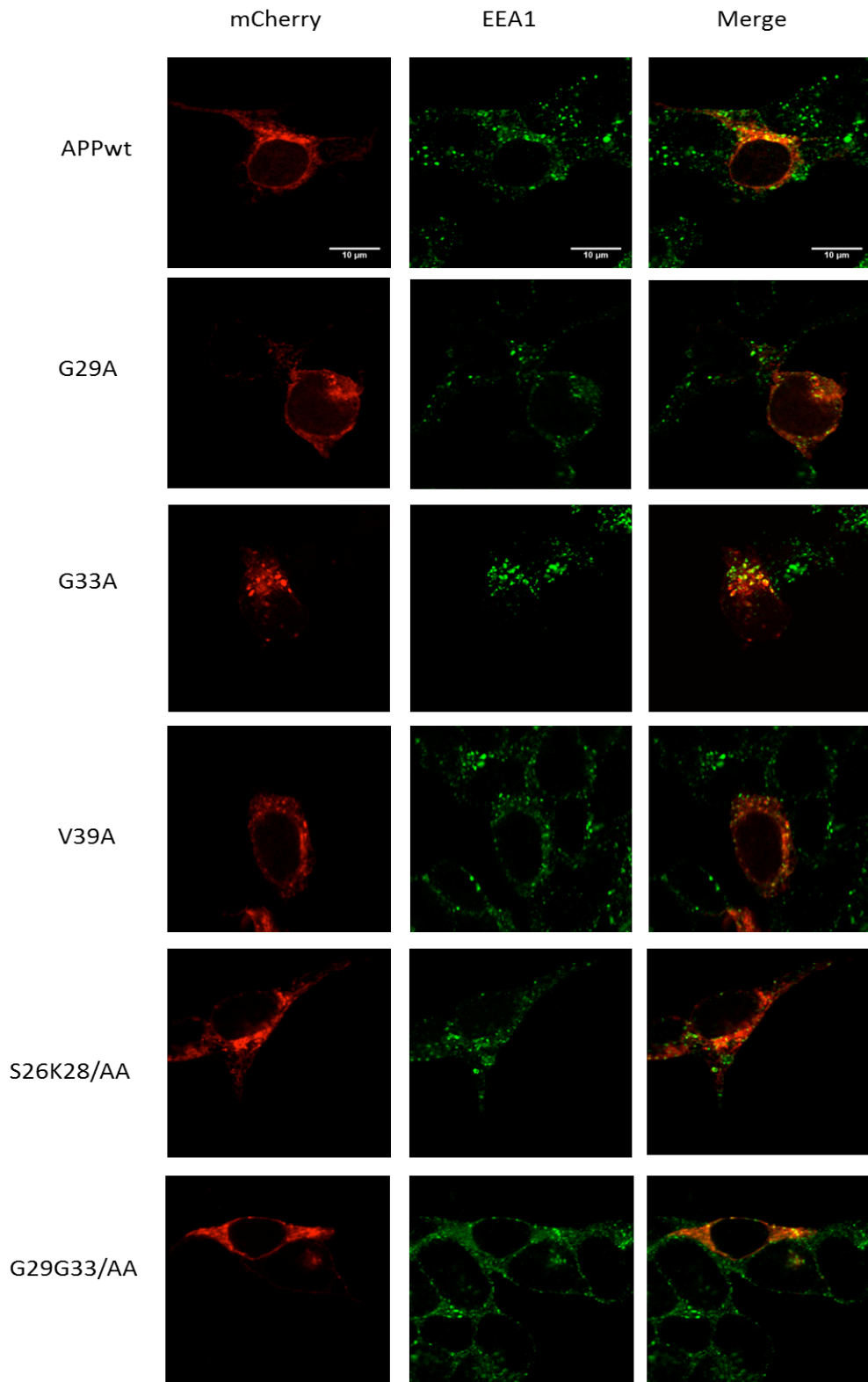


Figure 42 : Colocalisation des mutants du SLC dans les endosomes précoces.

Les cellules HEK293T transfectées avec les mutants G29A, G33A, V39A, S26K28/AA et G29G33/AA du SLC ont subi un immunomarquage à l'aide de l'anticorps EEA1 (marqueur des endosomes précoces, en vert). Les images ont été prises par microscopie confocale. Échelle 10µm.

Les résultats ne révèlent aucune différence de colocalisation des mutants dans les endosomes précoces excepté pour les mutants S26A et V39A avec une augmentation de la colocalisation de 13% et 17% respectivement. Globalement nous pouvons dire que pour la majorité des mutants nous avons une endocytose comparable à celle de l'APPwt. Nous avons donc une diminution des taux d'A β 40 et 42 sécrétés, qui n'est due ni à une accumulation d'A β intracellulaire ni à une diminution de l'endocytose des mutants du SLC. Les questions posées sont donc de savoir si les mutants du SLC modulent l'activité des sécrétases α , β et γ et si les mutations du SLC entraînent des changements de localisation de l'APP à la membrane plasmique (radeaux lipidiques).

3.3 Clivage des mutants par l'alpha, la bêta-sécrétase et la gamma-sécrétase

Nous avons analysé le clivage de l'APPwt et des mutants par les sécrétases. L'activité de la β -sécrétase est évaluée en mesurant les fragments sAPP β et CTFs en présence d'inhibiteurs de la γ -sécrétase (Figure 43). L'activité de l' α -sécrétase est évaluée en mesurant les fragments sAPP α et CTFs en présence d'inhibiteurs de la γ -sécrétase (Figure 43). Les cellules HEK293T transfectées avec les différents mutants du SLC sont traitées avec le N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl) - L -alanyl]-S-phenylglycine t-butyl Ester (DAPT) 5 μ M pendant 16h. Le blocage de l'activité de la γ -sécrétase conduit à l'accumulation des fragments C-terminaux α -CTF et β -CTF (Figure 44 et 45A), et des fragments solubles correspondant à l'ectodomaine de l'APP sAPP α et sAPP β (Figure 43). Les fragments sAPP α et sAPP β présents dans le milieu de culture ont été dosés par MSD. Les fragments C-terminaux sont mesurés par western blot (Figure 45A).

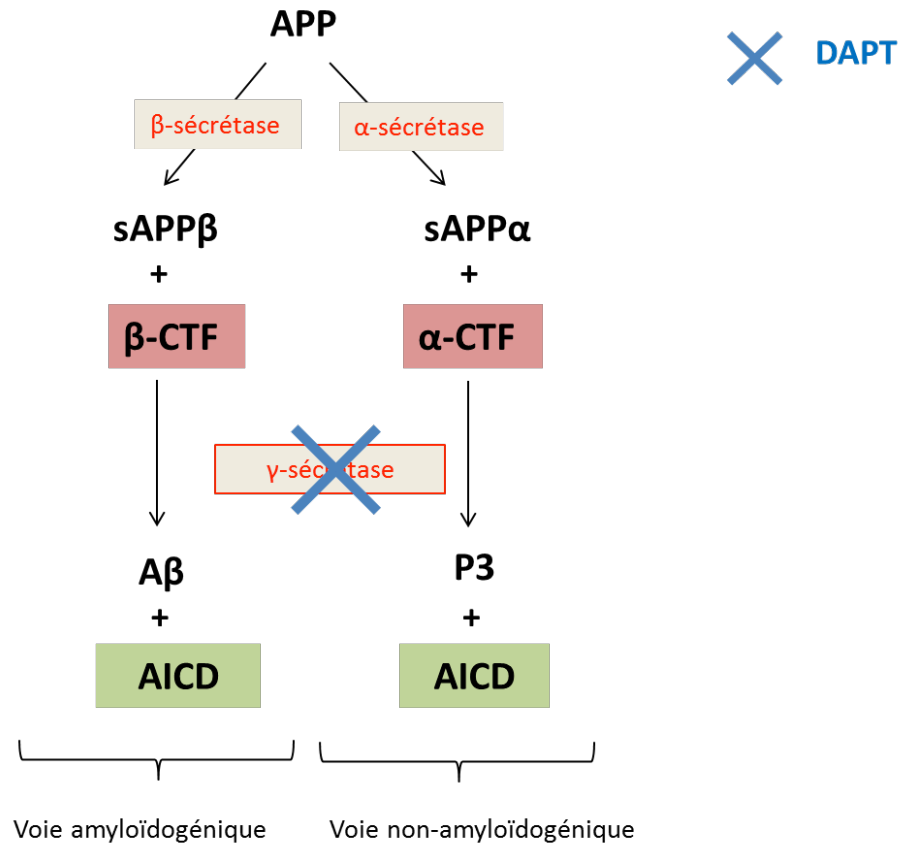


Figure 43 : Voies de clivages amyloïdogénique et non amyloïdogénique de l'APP. L'APP est clivée par la β ou l'α-sécrétase libérant ainsi dans le surnageant des cellules les fragments solubles sAPPβ et sAPPα. Le DAPT (en bleu) inhibe l'activité de la γ-sécrétase, accumulant ainsi dans les cellules les fragments C-terminaux β-CTF et α-CTF.

Lors de l'analyse de ces résultats je parlerai de fragments CTFs sans distinguer les α-CTFs des β-CTFs. En effet, la différence entre les α-CTFs-mCherry et les β-CTFs-mCherry est de seulement de 2KDa et je n'ai pas pu séparer ces deux formes dans mes expériences. La proportion de CTF est beaucoup plus grande que la proportion d'APP full length (Figure 44). Il m'a paru donc important de normaliser les résultats avec le taux de transfection correspondant à la somme des densités optiques des bandes APP et CTF.

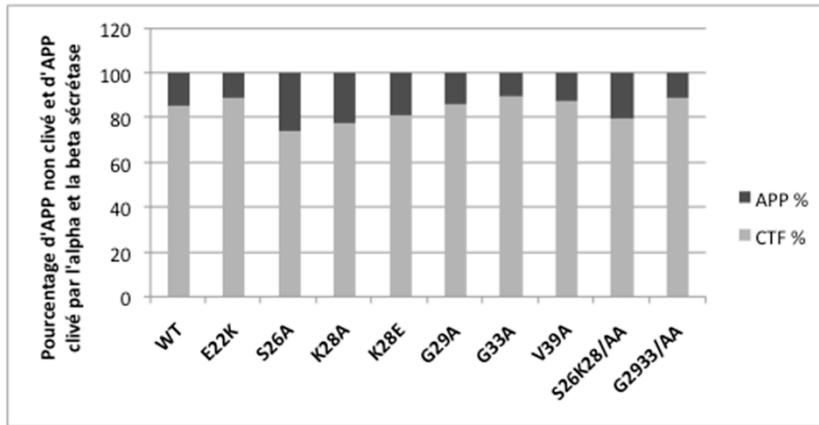
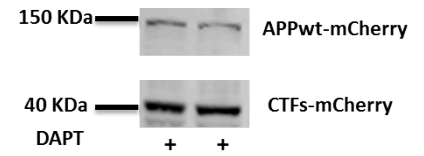
A**B**

Figure 44 : Clivage des mutants du SLC par l' α et la β -sécrétase dans les HEK293T transfectées.

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec les mutants du SLC de l'APP, puis ont subi 24h plus tard un traitement au DAPT pendant 16h. Un western blot a été réalisé à partir des lysats de cellules afin de détecter l'APP et les CTFs à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'APP C-terminal APP C17. **A** : La densité optique est mesurée pour les bandes APP-mCherry et CTFs-mCherry. Les résultats sont représentés en pourcentage. **B** : Exemple de western blot illustrant le clivage de l'APPwt par l' α et la β -sécrétase, en présence de DAPT.

Les résultats révèlent une diminution très légère et significative des taux de CTFs en présence de DAPT pour les mutants K28A et V39A (Figure 46A et B). De la même manière on observe une légère augmentation significative des CTFs pour le mutant transmembranaire G33A (Figure 46B). Les autres mutations (E22K, S26A, K28E, G29A, G29G33/AA) ne changent pas les taux de CTFs. Les taux d'AICD ne sont pas modifiés non plus par les mutations de l'APP en absence de DAPT (Figure 46 D, E, F). Dans cette expérience, l'analyse des taux d'AICD ne permet pas de différencier l'activité des sécrétases α , β et γ .

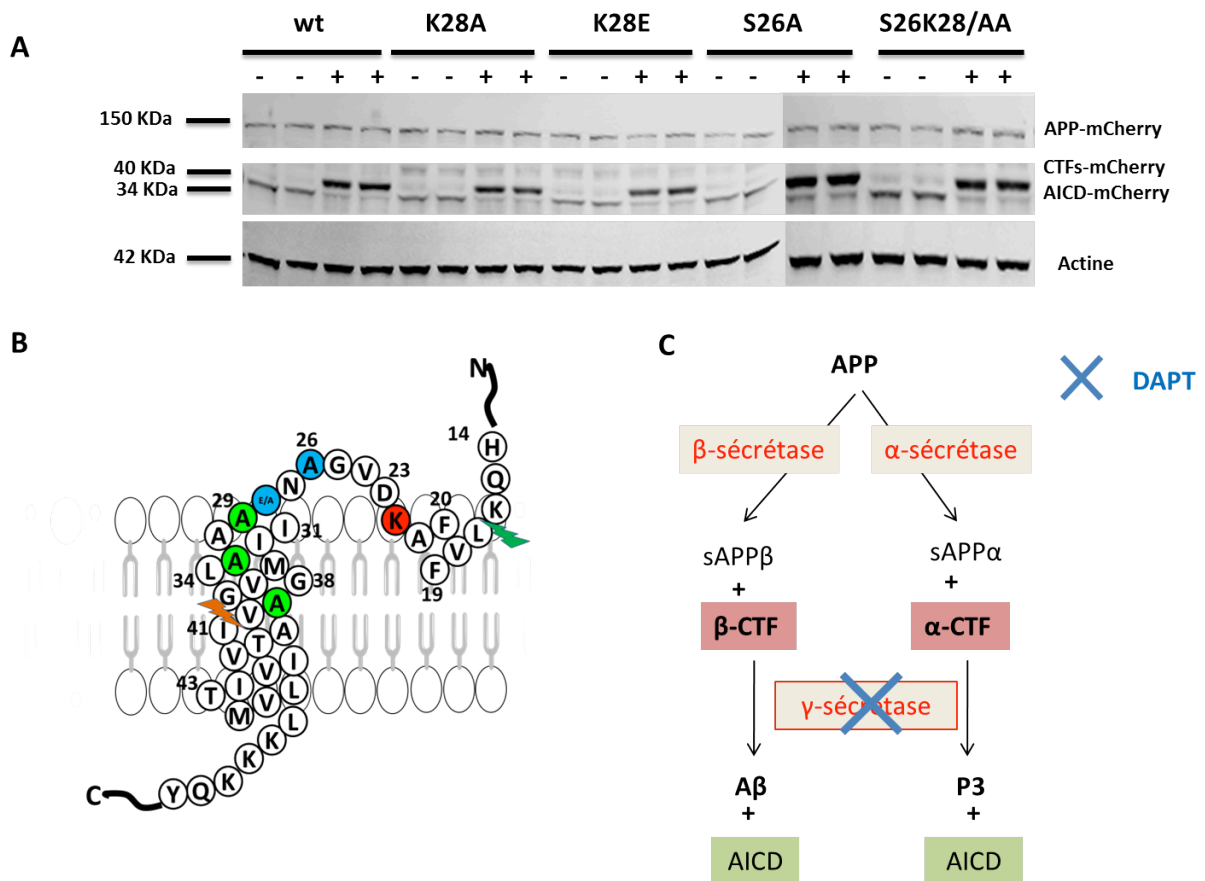


Figure 45 : Activité de l' α , β et γ -sécrétase sur les mutants du SLC dans les HEK293T transfectées.
A : 24h après la transfection des mutants du SLC, les cellules HEK293T ont été traitées au DAPT (5 μ M) pendant 16h. Un Western blot des lysats cellulaires a été effectué en utilisant un anticorps APP C-terminal C17. **B** : Représentation schématique du SLC de l'APP. Les résidus colorés représentent les 7 mutations ponctuelles effectuées sur le SLC de l'APP. En bleu, vert et rouge sont représentées les mutations juxtamembranaires, transmembranaires et familiales respectivement. **C** : Représentation schématique du clivage de l'APP par les sécrétases. Le DAPT (en bleu) inhibe l'activité de la γ -sécrétase.

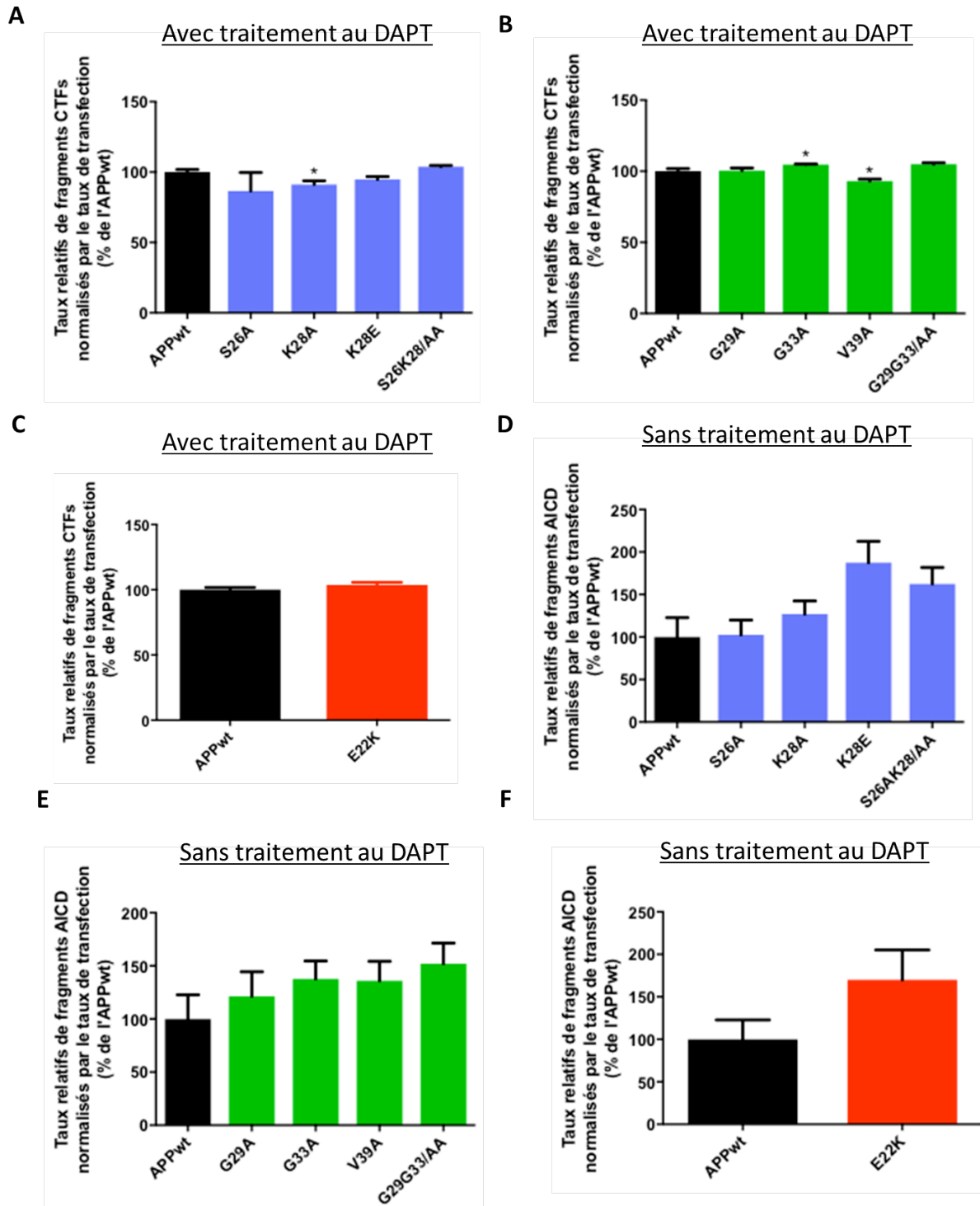


Figure 46 : Activité de l' α , β et γ -sécrétase sur les mutants du SLC dans les HEK293T transfectées. Les taux relatifs de fragments CTFs et AICD engendrés par les mutations juxtamembranaires (A, D), transmembranaires (B, E) et familiale (C, F) sont normalisés par les taux de transfection. (Test Mann Whitney, moyenne \pm SEM, * : $p=0.0260$ pour K28A, $p=0.0173$ pour G33A, $p=0.0260$ pour V39A, comparaison à APPwt, 3 expériences indépendantes avec $4 < n < 6$).

Enfin, les taux des sAPP α et sAPP β ont été mesurés par MSD, sur les surnageants des cellules HEK293T transfectées avec les mutants et traitées au DAPT 24h plus tard (Figure 47).

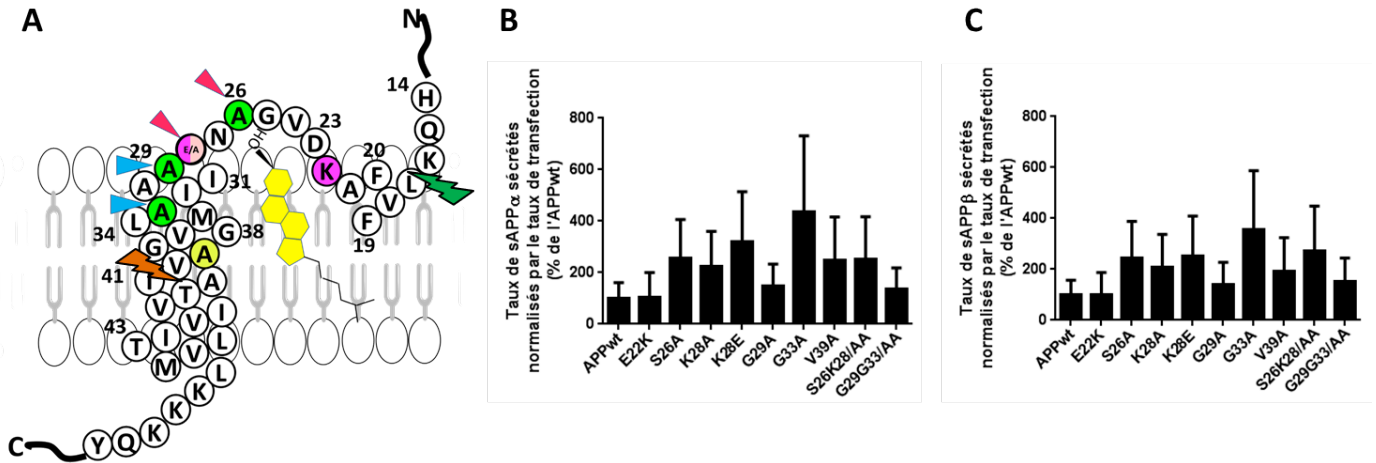


Figure 47 : Clivage des mutants du SLC par l' α et la β -sécrétase dans les HEK93T après traitement au DAPT. **A** : Représentation schématique du SLC de l'APP. Les résidus colorés représentent les 7 mutations ponctuelles effectuées sur le SLC de l'APP. **B** et **C** : Les HEK293T ont été transfectées avec les mutants du SLC, puis traitées 24h plus tard au DAPT (5 μ M) pendant 16h. Les surnageants ont été collectés et soumis à un dosage des sAPP α et sAPP β par MSD. Les résultats sont normalisés avec le taux de transfection (t test, moyenne +/- SEM, 3 expériences indépendantes avec 4<n<6).

Les résultats révèlent une très grande variabilité certainement due à la normalisation par le taux de transfection. Nous n'observons pas de différence significative des taux de sAPP α ou sAPP β sécrétés. Cependant la variabilité des résultats ne nous permet d'affirmer de façon certaine que nous n'avons pas de différence de clivage de l' α ou de la β -sécrétase mais seulement d'en émettre l'hypothèse. L'analyse des taux d'AICD nous permet de mesurer le clivage des trois sécrétases (Figure 43). Il n'y a pas de différence significative des taux d'AICD mesurés en absence de DAPT quelle que soit la mutation. Par déduction, en supposant que le clivage de l' α et la β -sécrétase ne change pas et que parallèlement le clivage global des trois sécrétases ne change pas non plus, nous pouvons supposer que nous n'avons pas de différence de clivage de la γ -sécrétase. Les très faibles variations de clivage observées (Figure 46 A, B, C) ne permettent pas d'expliquer les baisses très sévères d'A β 40 et 42 extracellulaires, ce qui pourrait signifier que nous n'avons pas de différences du clivage de l'APP par l' α et la β -sécrétase. En conclusion, les mutations du SLC diminuent la sécrétion de peptides amyloïdes A β 40 et 42, cette diminution n'est probablement pas engendrée par des différences de clivage des sécrétases.

En résumé, nous avons montré que les mutants du SLC diminuent la sécrétion d'Aβ40 et 42 sans changement de l'activité des sécrétases α, β et γ et sans changement de l'endocytose (excepté pour les mutants S26A et V39A). Nous avons classifié les mutants selon trois catégories. Les mutants juxtamembranaires augmentent la sécrétion de peptides courts tout en diminuant celle de peptides 40 et 42. Les mutants transmembranaires diminuent la sécrétion de peptides courts Aβ>28 mais également celle des peptides 40 et 42. Enfin la mutation familiale, bien que juxtamembranaire diminue la sécrétion de peptides courts Aβ>28 tout en diminuant celle des peptides 42. Les mutants du SLC pourraient entraîner un changement de conformation de la protéine conduisant à une modification de la position de la protéine dans la membrane plasmique. La position des mutants juxtamembranaires dans la membrane pourrait conduire à un décalage du clivage par la γ-sécrétase aboutissant à la formation de peptides plus courts. Les mutants transmembranaires pourraient probablement entraîner soit la production de peptides courts Aβ avec une taille inférieure à 28 acides aminés, soit inhiber l'activité de la γ-sécrétase sans affecter le clivage ε. La mutation familiale pourrait induire un changement de conformation de la protéine favorisant son agrégation et son accumulation intracellulaire tout en diminuant la sécrétion de peptides amyloïdes.

3.4 Effets d'une modulation de cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC

3.4.1 Mesure de la sécrétion de peptides amyloïdes après déplétion du cholestérol membranaire

Mon hypothèse est que la déplétion du cholestérol membranaire entraînerait une diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes pour l'APPwt, mais également pour les mutants du SLC. En effet, les mutants inhiberaient l'interaction avec le cholestérol et une déplétion du cholestérol membranaire ne devrait pas avoir d'effet sur la sécrétion de peptide amyloïdes. J'ai étudié les effets d'une déplétion du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC en administrant la MBCD aux cellules HEK293T, qui extrait le cholestérol membranaire (Figure 48). Après traitement à la MBCD, on observe 10 fois et 11 fois moins d'Aβ40 et 42 respectivement pour les cellules HEK293T exprimant l'APPwt contre 4 fois et 6 fois moins d'Aβ40 et 42 respectivement pour les cellules exprimant le mutant K28A. La mutation K28A permet de donner des taux d'Aβ40 et 42 extracellulaires en condition contrôle presque aussi faibles que ceux mesurés après traitement à la MBCD.

Nous pouvons conclure que la mutation K28A est moins sensible aux effets de la MBCD car elle est située dans le SLC de l'APP. Nous montrons donc que c'est bien l'interaction de l'APP avec le cholestérol qui est responsable de la modulation de la sécrétion de peptides amyloïdes. Nous démontrons également que l'extraction du cholestérol par la MBCD a tout de même un effet sur la sécrétion de peptides amyloïdes avec une diminution significative de celle-ci.

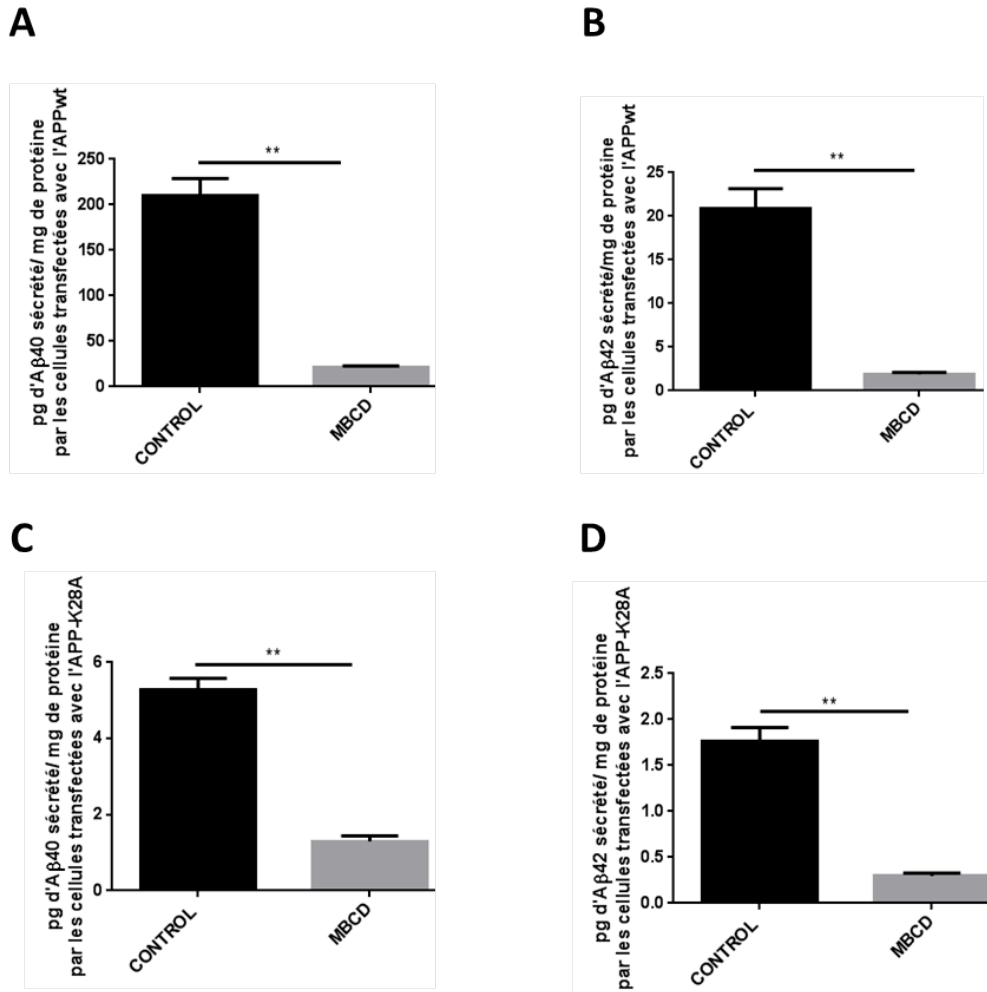


Figure 48 : Modulation de la sécrétion de peptides amyloïdes par l'APPwt et le mutant K28A après extraction du cholestérol membranaire par la MBCD.

Les cellules HEK293T sont transfectées avec l'APP-mCherry wt ou le mutant K28A, et subissent 24h plus tard un traitement à la MBCD (10mM). Les surnageants collectés 8h après traitement, sont soumis à un dosage MSD à l'aide de l'anticorps de détection 6E10. Les taux d'Aβ40 (A, C) et d'Aβ42 (B, D) sont normalisés avec la quantité de protéines intracellulaires déterminée par dosage Bradford (Test Mann-Whitney, une expérience, moyenne +/-SEM, ** : p<0.01, p=0.079, n=5 puits).

3.4.2 Mesure de la sécrétion de peptides amyloïdes après augmentation du cholestérol membranaire

L'équipe a montré qu'une augmentation du cholestérol à la membrane plasmique entraîne une augmentation de l'endocytose suivie d'une augmentation de la sécrétion de peptides amyloïdes dans les HEK293T (J. C. Cossec et al. 2010) exprimant l'APP muté (mutation swedish) et dans des cultures primaires de neurones (Marquer et al. 2014). J'ai donc voulu voir si les effets du cholestérol sur la sécrétion de peptides amyloïdes sont retrouvés avec les mutants du SLC. J'ai transfecté les HEK293T avec l'APPwt, et j'ai ensuite traité ces cellules 24h plus tard avec le complexe méthyl- β -cyclodextrine-cholestérol (MBCD-C). Ce complexe permet l'incorporation du cholestérol spécifiquement dans la membrane plasmique (López, de Vries, and Marrink 2011). Par la suite, un dosage MSD (anticorps 6E10) sur les surnageants des cellules a été effectué. À la vue de la non reproductibilité des résultats sur les cellules transfectées avec l'APPwt, je n'ai pas pu conclure sur les résultats obtenus avec les mutants du SLC. Les résultats de ces expériences ont révélé des augmentations des taux d'A β 38, 40 et 42 pour les cellules transfectées avec l'APPwt qui n'ont malheureusement pas été reproductibles d'une expérience à l'autre.

3.4.3 Analyse de la localisation de l'APPwt et l'APP-K28A dans les radeaux lipidiques

Mon équipe a montré qu'une augmentation du cholestérol membranaire permet la relocalisation de l'APP et de Bace1 (β -sécrétase) dans les radeaux lipidiques (Marquer et al. 2011) suivie d'une augmentation de l'endocytose et d'une augmentation de la sécrétion de peptides amyloïdes (J. C. Cossec et al. 2010; Marquer et al. 2014). Mon hypothèse était que les mutations permettent d'abolir l'interaction de l'APP avec le cholestérol et par conséquent sa localisation dans les radeaux lipidiques. Les résultats attendus étaient donc une diminution des taux d'APP mutés dans les radeaux lipidiques par rapport à l'APPwt. Les radeaux lipidiques sont des parties de la membrane plasmique résistantes aux détergents. Après ultracentrifugation (pendant 17h), je collecte plusieurs fractions dont celles correspondant aux radeaux lipidiques que j'analyse par western blot avec les anticorps dirigés contre l'APP et la flotilline (protéine retrouvée dans les radeaux lipidiques). J'ai décidé de mettre au point ces expériences dans un premier temps avec l'APPwt et l'APP muté K28A. Deux expériences sur trois ont révélé que l'APPwt ne se trouvait pas dans les fractions correspondant aux radeaux

lipidiques contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature (fractions 3, 4 et 5 d'après les bandes flotilline, Figure 49). Cette expérience demande des mises aux points supplémentaires pour pouvoir valider notre hypothèse.

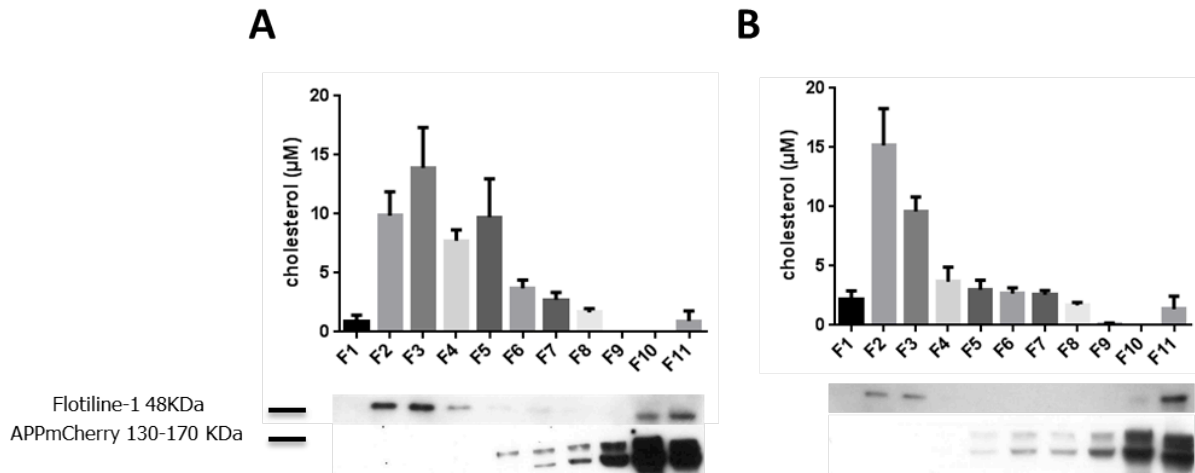


Figure 49 : Analyse de la localisation du mutant K28A dans les radeaux lipidiques.

Les cellules HEK293T sont transfectées avec l'APPwt (**A**) ou l'APP muté K28A (**B**). Les lysats cellulaires récupérés 24h après transfection sont incubés avec le détergent Brij58 (2%) pendant 30 min et soumis à une ultracentrifugation pendant 17h. Un western blot est réalisé sur les 11 fractions (F1 à F11) récupérées avec les anticorps dirigés contre l'APP et la flotilline-1. Le cholestérol est dosé dans chacune des fractions à l'aide du kit Amplex red cholesterol pour trois expériences indépendantes. La moyenne des concentrations de cholestérol de chaque fraction sur les trois expériences est réalisée. (n=6 pour la mutation K28A et n=3 pour l'APPwt).

En conclusion (Figure 50), nous avons montré que les mutants du SLC diminuent les taux d'A β 40 et 42 extracellulaires de manière très importante, sans changer l'activité de clivage de l'APP par l' α , β et γ -sécrétase (Figure 50 B, C, D, **étape 5**) et sans changement d'endocytose des mutants (**étape 2**). J'ai pu mettre en évidence trois groupes de mutations se comportant différemment au niveau de la sécrétion de peptides A β >28. Les mutations juxtamembranaires S26A, K28A, K28E et S26K28/AA pour lesquelles on trouve une augmentation des taux d'A β >28, ce qui montre que pour ces mutations la production de peptides longs (40 et 42) est diminuée alors que celle de peptides de tailles plus courtes est augmentée (Figure 50B). Nous pouvons supposer que la γ -sécrétase clive donc normalement en libérant l'AICD mais que le nombre de cycles de clivages est augmenté. Les mutations abolissent l'interaction avec le cholestérol ce qui permettrait à la γ -sécrétase de cliver en plusieurs étapes l'APP jusqu'à la production de peptides courts d'A β . La seconde hypothèse serait que nous avons un décalage du clivage de la γ -sécrétase coupant plus haut sur l'APP et libérant des peptides de tailles plus courtes. Les mutants transmembranaires quant à eux diminuent l'A β 40 et 42 (Figure 50C,

étape 5), mais également l'Aβ>28 sans influencer les taux d'AICD. Nous pouvons supposer que ces mutations transmembranaires entraînent un changement de conformation de l'APP, le transformant en mauvais substrat pour la γ-sécrétase, ou bien que nous avons une production de peptides Aβ avec une taille inférieure à 28 acides aminés non détectable par notre kit dans nos expériences. Cependant, le clivage de l'α-sécrétase est majoritaire dans les HEK293T avec environ 30 fois plus de sAPPα que de sAPPβ libéré dans le surnageant des cellules exprimant l'APPwt. Dans le cas où nous aurions une diminution des taux d'AICD produits dans la voie amyloïdogénique, nous ne pourrions pas détecter cette différence par western blot à la vue des très faibles taux de sAPPβ libérés. La mutation italienne E22K, bien que juxtamembranaire n'augmente pas les taux d'Aβ>28 sécrétés (Figure 50D, **étape 5**). Nous pouvons supposer que cette mutation engendre une accumulation intracellulaire de peptides sous formes de fibrilles ou d'oligomères (Miravalle et al. 2000; Baumketner, Krone, and Shea 2008) rendant impossible la détection par le kit MSD (**étape 4**).

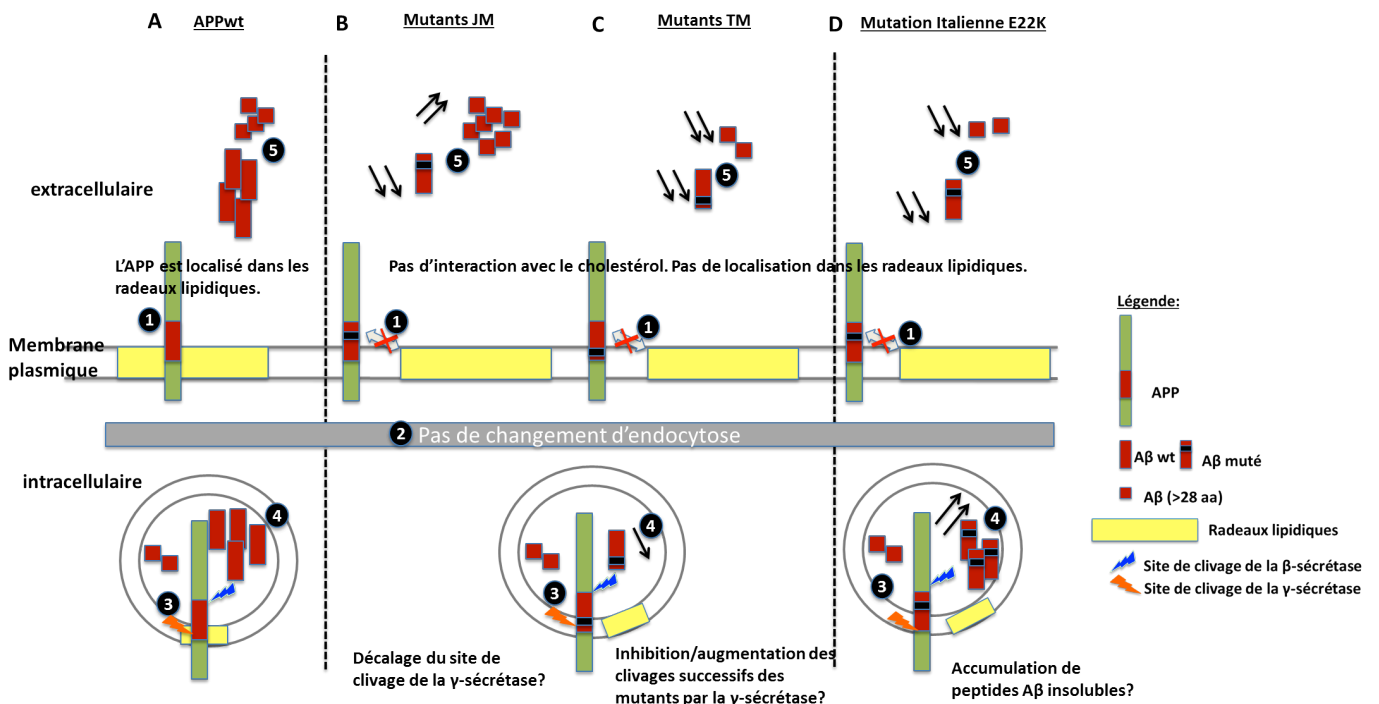


Figure 50 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).

A : L'APPwt transmembranaire (en vert) se trouve dans les radeaux lipidiques (en jaune) (**étape 1**). L'APPwt est endocyté (**étape 2**) et clivé dans les endosomes par la β-sécrétase puis la γ-sécrétase (**étape 3**). Ce clivage aboutit à la production de peptides intracellulaires (**étape 4**) et à la sécrétion de peptides (**étape 5**) Aβ40, Aβ42 (en rouge) et Aβ>28 (en bleu). **B, C, D** : Mécanismes d'endocytose, de clivage et de sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants juxtamembranaires, transmembranaires et la mutation familiale.

Nous avons vu que le SLC joue un rôle central dans la sécrétion des peptides amyloïdes dans les cellules HEK293T. Il est donc important de connaître les mécanismes reliant le cholestérol, l'ApoE (son transporteur) et l'A β dans les neurones.

3.5 Effets du génotype ApoE sur la sécrétion d'A β et l'expression de protéines intracellulaires

3.5.1 Sécrétion de peptides A β 38, 40 et 42

L'ApoE joue un rôle important dans le transport des lipides et participe à l'homéostasie du cholestérol de manière isoforme dépendante. En effet, les apolipoprotéines E4 sont moins lipidées que les apolipoprotéines E3 (Fu et al. 2016). L'ApoE est moins efficace que les autres isoformes (E2 et E3) dans l'efflux du cholestérol des neurones et des astrocytes (Michikawa et al. 2000).

En plus d'avoir été identifié comme étant le facteur de risque génétique majeur de développer la MA (Corder et al. 1993; Saunders et al. 1993), l'ApoE participe à l'agrégation de l'A β ainsi qu'à sa dégradation (Ronald B. DeMattos et al. 2004; Kanekiyo and Bu 2014). *In vivo*, l'ApoE4 ralentit la clairance de l'A β et s'accumule dans l'hippocampe de souris transgéniques de manière plus importante que l'ApoE3 (Castellano et al. 2011). L'ApoE4 est moins affin pour l'A β et est plus susceptible de subir un clivage protéolytique par rapport à l'ApoE3 (Brecht et al. 2004; Y Huang et al. 2001; Harris et al. 2003). L'ApoE est étroitement lié à l'accumulation de la protéine tau, de la protéine tau-phosphorylée et conduit à la mort des neurones GABAergiques (G. Li et al. 2009). Cette apolipoprotéine joue donc un rôle clé dans la pathologie de la MA mais les mécanismes impliqués restent encore incompris à ce jour.

Afin de mieux comprendre les mécanismes reliant l'ApoE, et l'A β nous avons étudié dans un premier temps l'effet du génotype ApoE sur la sécrétion naturelle de peptides amyloïdes par les neurones primaires en culture. Pour cela nous disposons de souris KI hApoE3 et hApoE4 de Taconics exprimant les différentes isoformes de l'ApoE humain (souris chez lesquelles le gène ApoE souris est remplacé par le gène humain). J'ai mis au point des cultures primaires de neurones de cortex à partir de nouveaux nés car nous n'avons pas l'autorisation de Taconics d'établir un élevage. Les surnageants des neurones corticaux ApoE4 et ApoE3 ont

été collectés à différents temps de culture (DIV5, DIV9 et DIV12), et un dosage des peptides A β 38, 40 et 42 a été effectué par MSD sur ces surnageants à l'aide de l'anticorps de détection 4G8 (Figure 51).

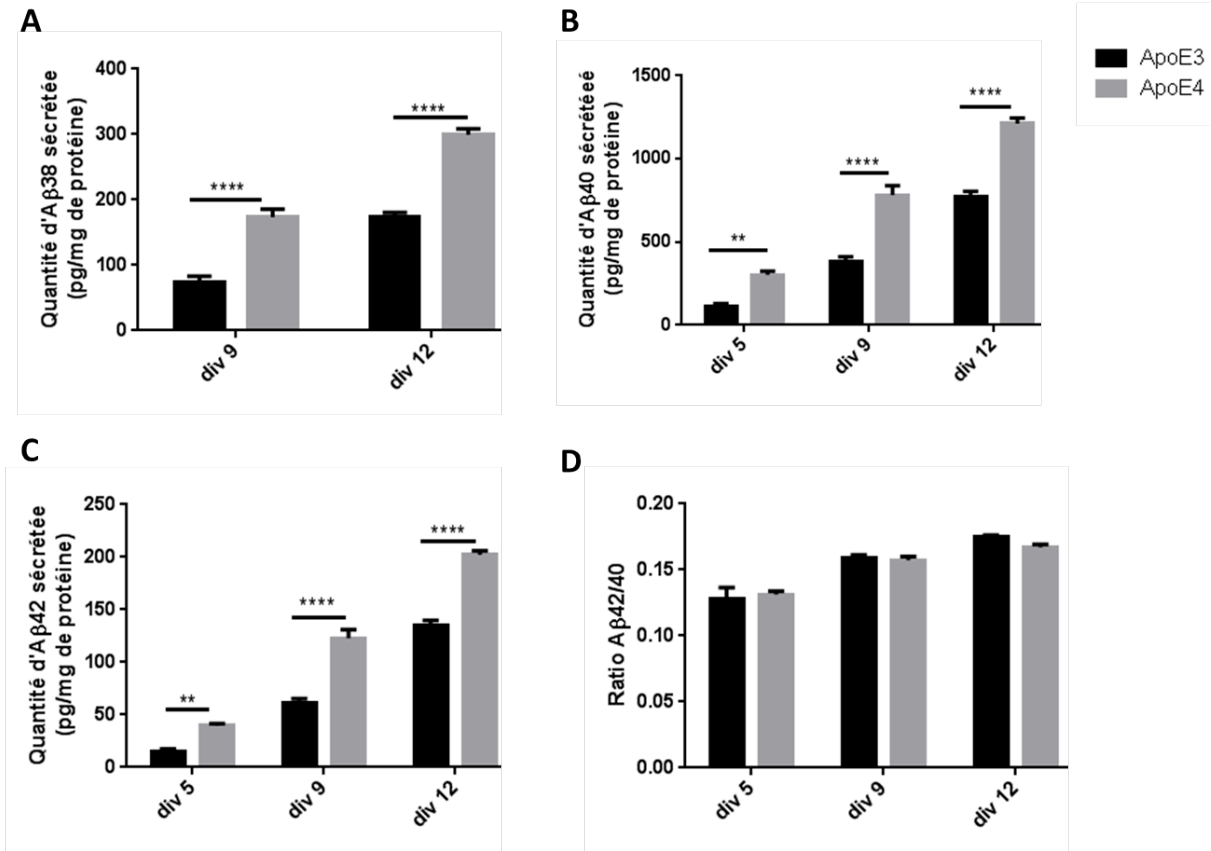


Figure 51 : Mesure de la production de peptides A β 38, 40 et 42 extracellulaire de neurones corticaux ApoE3 et ApoE4.

A, B, C : Les taux d'A β 38, 40 et 42 sont mesurés par MSD à l'aide de l'anticorps de détection 4G8 à trois temps de culture. **D** : Les ratios A β 42/40 sont représentés à chaque temps de culture. Les résultats sont normalisés avec la quantité de protéines intracellulaires déterminée par dosage Bradford (Test ANOVA two way, moyenne \pm SEM, ** : $p < 0,05$, **** : $p < 0,0001$, dosage en duplicat avec $n=6$ par condition sur une expérience).

Ces résultats mettent en évidence une forte augmentation de la sécrétion d'A β en fonction du nombre de jours de culture. Les neurones ApoE4 secrètent 2,7 fois plus d'A β 40 et 42 dès DIV5, par rapport aux neurones ApoE3 (Figure 51B et C, table 4). À DIV9, les neurones ApoE4 secrètent 2 fois plus d'A β 40 et 42, et 2,4 fois plus d'A β 38 que les neurones ApoE3. À DIV 12, cette augmentation est un peu moins importante qu'à DIV5 et DIV9 mais reste élevée avec au minimum 1,5 fois plus d'A β 42 sécrété. L'A β 38 est sécrété très faiblement à DIV5 et n'est donc pas détecté (Figure 51A). Il n'y a pas de différence des ratios A β 42/40 entre ces deux isoformes, quel que soit le temps de culture des neurones.

Nous pouvons conclure que le génotype ApoE4 favorise la sécrétion de peptides amyloïdes. Cependant, nous n'avons pas observé de toxicité sur ces cultures (corps cellulaires et prolongements neuronaux intacts).

3.5.2 Analyse de l'expression des protéines intracellulaires : tau, phospho-tau, ApoE et APP

Afin de caractériser ces différents génotypes, j'ai procédé à l'analyse de l'expression de différentes protéines impliquées dans la pathologie. Les lysats de neurones récupérés au stade DIV12 sont analysés par western blot (Figure 52).

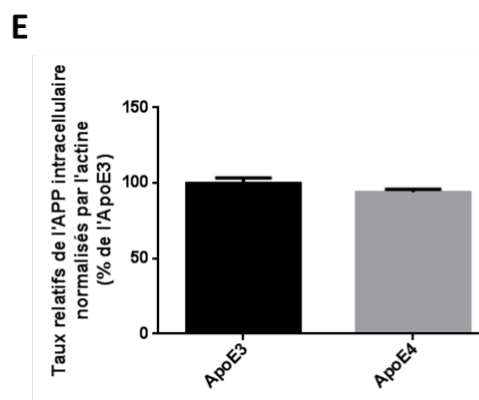
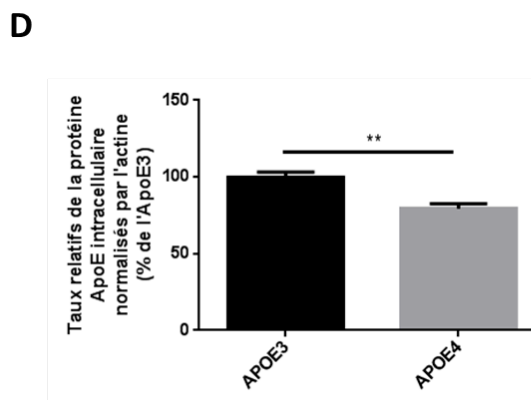
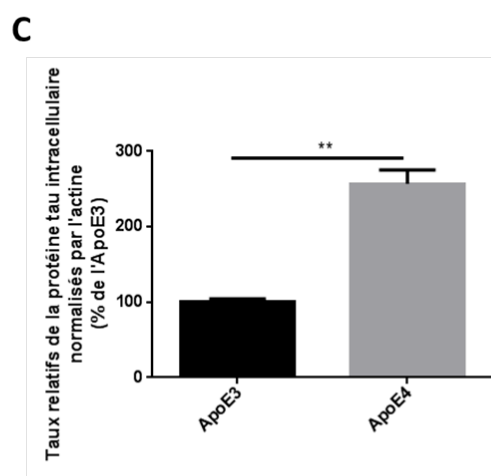
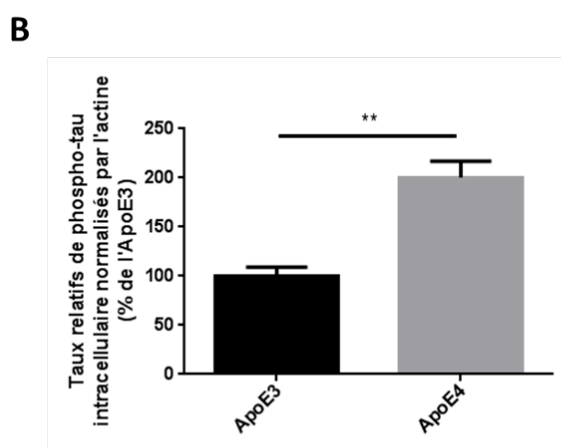
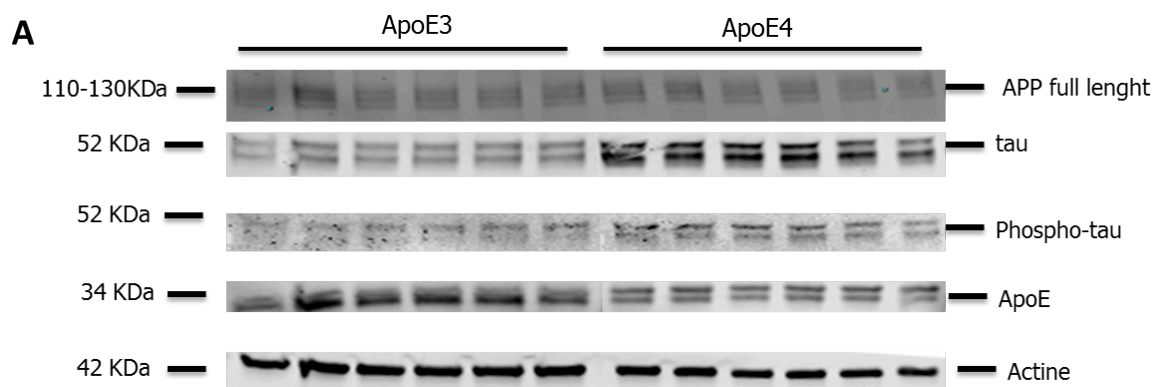


Figure 52 : Quantification de l'expression des protéines intracellulaires Tau, phospho-tau, ApoE et APP dans des cultures de neurones ApoE3 et ApoE4 à DIV12.

A : Analyse par Western blot des lysats de neurones ApoE3 et ApoE4, à l'aide des anticorps dirigés contre tau, phospho-tau, ApoE et l'APP. **B, C, D et E** : L'expression des protéines est quantifiée en analysant la densité optique des bandes correspondantes. Les résultats sont normalisés avec l'actine β et rapporté en pourcentage d' $A\beta$ sécrété par les neurones ApoE3 (Test Mann-Whitney, moyenne \pm SEM, ** : $p < 0,01$, quantification sur une culture, $n=6$ puits par culture).

Les neurones ApoE4 expriment 2.6 fois plus de protéines tau et 2,2 fois plus de protéines tau phosphorylées par rapport aux neurones ApoE3. En revanche, les neurones ApoE3 produisent

20% en plus d'ApoE « full length ». Ce qui suggère que les neurones ApoE4 produisent certainement plus de fragments neurotoxiques ApoE. Il serait intéressant d'étudier par la suite l'expression de la synaptojanine-1 dans ces cultures primaires de neurones. La synaptojanine-1 est une phosphatase qui supprime un phosphate aux molécules de phosphatidyl-inositol (4,5) - biphosphates (PIP2) pour former des phosphatidyl-4-phosphates (PIP). La synaptojanine est impliquée dans l'endocytose et sa surexpression dans les cellules de neuroblastome est responsable du phénotype d'endosomes élargis (J.-C. Cossec et al. 2012). De façon intéressante, une étude montre dans les cerveaux de souris ApoE4 KI et dans les cerveaux de patients ApoE4 atteint de la MA que les taux de PIP2 sont réduits (Zhu et al. 2015). À l'inverse, l'abolition de l'expression de la synaptojanine dans ces souris ApoE4 KI restaure les taux de PIP2 et réduit les déficits cognitifs. L'ApoE4 contrairement à l'ApoE3, perd sa capacité à réguler la dégradation des ARNm SYNJ1. La synaptojanine est donc un régulateur des phospholipides. Ainsi cibler l'homéostasie des phospholipides par l'intermédiaire de l'expression de la synaptojanine pourrait modifier le phénotype pathogénique de l'ApoE4 (Zhu et al. 2015).

Discussion

4 Discussion

Nous nous sommes intéressés au SLC car mon équipe a montré qu'une modulation du cholestérol membranaire entraîne des changements sévères de la sécrétion d'A β (J. C. Cossec et al. 2010; Marquer et al. 2014). Le SLC de l'APP est constitué d'environ 20 acides aminés et se trouve sur la séquence de l'A β avec une partie juxtamembranaire et une partie transmembranaire. Nous avons montré grâce à la technique de RPS que des mutations effectuées sur le SLC de l'APP inhibent totalement l'interaction de l'APP avec le cholestérol. Afin d'étudier plus précisément le SLC, nous avons généré 3 types de mutants : des mutants juxtamembranaires (S26A, K28A, K28E et S26K28/AA), des mutants transmembranaires (G29A, G33A, V39A et G29G33/AA) et une mutation familiale (mutation italienne E22K). Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les mutants du SLC de l'APP. Nous avons montré que les mutations du SLC diminuent la sécrétion de l'A β 40 et 42 ce qui est en accord avec plusieurs études (Ren et al. 2007; Page et al. 2010; Kukar et al. 2011). Cette diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes n'affecte pas le clivage ϵ des mutants par la γ -sécrétase et ne modifie pas l'endocytose de ces mutants (exceptés pour la S26A et la V39A). Nous avons mesuré la sécrétion de peptide amyloïdes A β >28 et avons constaté que les mutants affectent de façon différente ce paramètre. En effet, les mutants juxtamembranaires augmentent la sécrétion de peptides A β >28, les mutants transmembranaires diminuent cette sécrétion et la mutation familiale bien que juxtamembranaire diminue également la sécrétion de peptides A β >28 (Figure 53).

Mutants	Familiale	Juxtamembranaire	Transmembranaire	A β >28	A β 40	A β 42
E22K	✓	✓		↘	=	↘
S26A K28A K28E S26K28/AA		✓		↗	↘ *S26A	↘
G29A G33A V39A G29G33/AA			✓	↘	↘	↘ *G33A

Figure 53 : Classification des mutants du SLC en trois catégories selon la sécrétion de peptides amyloïdes.

Les mutations sont regroupées en trois classes : mutation familiale, juxtamembranaire et transmembranaire. * S26A, *G33A : excepté le mutant S26A et G33A.

Les mutants du SLC entraînent probablement un décalage du site de clivage de la γ -sécrétase et/ou augmentent sa capacité à effectuer plusieurs cycles de clivages successifs conduisant à la formation de peptides courts d'A β . Dans un premier temps nous traiterons de l'importance de certains acides aminés dans l'interaction avec le cholestérol, puis nous discuterons dans un second temps les effets des mutations sur la sécrétion de peptides amyloïdes et le clivage des mutants par les sécrétases. J'exposerai également les hypothèses concernant les effets de la modulation du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC et sur l'endocytose de ces mutants. Enfin, nous discuterons des résultats obtenus sur les effets du génotype ApoE sur la sécrétion de peptides amyloïdes et l'expression de protéines intracellulaires.

4.1 Le SLC de l'APP : un domaine de liaison au cholestérol atypique

Il existe plusieurs protéines qui interagissent avec le cholestérol par le biais d'une séquence CRAC (« Cholesterol **R**ecognition/**I**nteraction **A**mino acid **C**onsensus »). La séquence CRAC est un très court motif composé d'un acide aminé neutre et hydrophobe, tel que la leucine ou la valine, un acide aminé neutre et polaire (aromatique) tel que la tyrosine et acide aminé basique tel que l'arginine ou la lysine (H. Li and Papadopoulos 1998). Ces acides aminés sont séparés généralement par un groupe d'acides aminés avec un nombre compris entre 1 et 5, ce qui donne la séquence CRAC suivante : (Nter)-L/V-(X)₁₋₅-Y-(X)₁₋₅-R/K-(Cter). Ce motif a été retrouvé dans plusieurs protéines connues pour interagir avec le cholestérol telles que les apolipoprotéines A-I (Boyle and Marotti 1992), les cytochromes P450 (Su et al. 1990), la cholestérol oxydase (Ishizaki et al. 1989) ou encore acyl-CoA cholestérol acyl transférase (Pape et al. 1995; H. Li and Papadopoulos 1998). De plus, des mutations simples dans le domaine CRAC ont montré de très fortes diminutions de l'interaction avec le cholestérol, comme par exemple la tyrosine qui semble importante dans cette interaction et qui ne peut être remplacée par aucun autre acide aminé aromatique (Jamin et al. 2005; R. M. Epanand 2006; R. F. Epanand et al. 2006). Dans notre cas le SLC considéré comme étant la partie 20-39 de l'A β , ne correspond pas au motif CRAC (pas de tyrosine dans le SLC). Cependant, le SLC

présente des similitudes avec cette séquence comprenant un acide aminé neutre et hydrophobe tel que la valine 24 et un acide aminé basique tel que la lysine 28.

Un nouveau domaine d'interaction au cholestérol avec une séquence très similaire au motif CRAC mais présentant une orientation opposée le long de la chaîne polypeptidique, que l'on appelle motif CARC a été décrit récemment : (Nter)-K/R-(X)₁₋₅ -Y/F-(X)₁₋₅ -L/V-(Cter) (Baier, Fantini, and Barrantes 2011). Contrairement au motif CRAC, l'acide aminé aromatique central du motif CARC peut être une tyrosine ou une phénylalanine. L'acide aminé basique (lysine ou arginine) est situé à l'interface apolaire/polaire d'un domaine transmembranaire, ce qui correspond à la position du cholestérol.

Il existe donc différents sites de liaison du cholestérol possédant ou non des motifs précis de liaison (tels que les motifs CRAC ou CARC). Cependant, nous pouvons constater des mécanismes communs qui semblent contrôler l'interaction des protéines transmembranaires avec le cholestérol. Ces mécanismes comprennent une zone polaire qui accueille le groupe hydroxyle OH du cholestérol (à l'interface membrane/eau) et des interactions de van der Waals dans la zone apolaire de la membrane.

Notons que le SLC, bien qu'il ne possède pas de tyrosine ou de phénylalanine en position centrale, présente la lysine 28 juxtamembranaire qui pourrait interagir avec le cholestérol par sa charge positive. La leucine et la valine interagissent avec le cholestérol par de nombreuses interactions van der Waals, ce qui permet à ces acides aminés d'épouser les aspérités du cholestérol (Fantini and Barrantes 2009). Le SLC de l'APP n'est en effet pas un site classique puisqu'il ne fait pas partie des sites de liaison décrits (CRAC ou CARC), mais est classé dans la catégorie de peptides nommés « titled peptides ». Ces peptides sont de courts fragments de protéines hélicoïdales capables de perturber l'organisation du système moléculaire dans lequel ils s'insèrent (membrane plasmique). Ils sont caractérisés par une répartition asymétrique de leurs résidus hydrophobes ce qui conduit à une orientation inclinée de la protéine dans la membrane plasmique (Lins et al. 2008). La liaison de ces peptides avec le cholestérol se fait le plus souvent par des interactions van der Waals. Le SLC de l'APP a fait l'objet de plusieurs études structurales par RMN (Beel et al. 2008; Barrett et al. 2012). Ces études présentent les déplacements chimiques de C99 en présence de cholestérol (incorporé dans des bicelles). Les auteurs montrent que des mutants juxtamembranaires et transmembranaires sont impliqués dans l'interaction avec le cholestérol : F20, E22, G29, I32, G33 et V39. Ces études ont orienté le choix des mutations étudiées dans mon projet de thèse. Une autre étude démontre

l'existence d'un SLC par la méthode de Langmuir, en utilisant les peptides (« titled peptides ») A β 22-35 (Di Scala et al. 2013). La comparaison du SLC entre différentes espèces révèle que ce site est conservé et met en évidence son importance (Figure 54). Le SLC correspond donc à une zone où s'exerce une pression de sélection pour maintenir la fonction.

Espèces	Séquence de l'A β
Humain	KMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Souris	KMDAEFGHDSGFEVRRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Rat	KMDAEFGHDSGFEVRRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Chimpanzé	KMDAEFGHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Macaque	KMDAEFGHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Singe écureuil	KMDAEFGHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Cochon	KMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Lapin	KMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT
Mouton	KMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT

Figure 54 : Comparaison des séquences de l'A β contenant le SLC en rouge selon les espèces. La comparaison a été effectuée à partir des séquences retrouvées dans le lien suivant : www.uniprot.org. Le SLC définit ici comme étant la séquence 20-39 (en rouge), ne varie pas selon les espèces. La partie C-terminale de l'A β , présente quelques variations (identifiées en bleu).

Nous avons montré que muter ce site de liaison entraîne des diminutions importantes de la sécrétion d'A β par les HEK293T. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés de plus près à ce site. Nous avons effectué quatre mutations sur le SLC (F18S, F19S, S26A et K28D) et avons montré pour la première fois par RPS que muter ce site permet d'abolir l'interaction avec le cholestérol. Bien que les mutations ne soient pas identiques à celles retrouvées dans le peptide muté APP2, nous pouvons dire que les positions 26 et 28 sont des positions clés pour l'interaction avec le cholestérol mais également pour la sécrétion de peptides amyloïdes. Nous confirmons également les données d'une étude qui montre que la mutation de la phénylalanine 19 en sérine (F19S) abolit totalement l'interaction entre l'A β 42 et le cholestérol, suggérant que la chaîne latérale aromatique de la phénylalanine 19 est critique pour la liaison avec le cholestérol (X. Zhou and Xu 2013). De plus, les acides aminés S26 et K28 ont également été mutés dans les plasmides exprimant l'APPwt-mCherry (double mutation S26K28/AA), et diminuent la sécrétion de peptides amyloïdes dans les HEK293T. En conclusion, nous validons donc le SLC par la technique de RPS et d'autre part *in cellulo* avec une diminution de la production de peptides amyloïdes par les mutants du SLC. Cependant nous n'avons pas de confirmation directe de l'interaction avec le cholestérol *in cellulo* (mais une confirmation indirecte avec le traitement MBCD). Une autre étude met en

évidence un site de liaison du cholestérol impliquant l'utilisation de peptides A β (Di Scala et al. 2013). Dans cette étude, les auteurs utilisent l'A β 22-35 et montrent par la méthode de Langmuir que les acides aminés V24 et K28 sont essentiels à l'interaction entre le cholestérol et le SLC de l'APP. La lysine 28 chargée positivement pourrait à elle seule avoir un rôle très important dans l'interaction avec le cholestérol et pourrait interagir avec le groupe hydroxyle OH du cholestérol (Figure 55). Le rôle de la valine 24 n'est pas négligeable dans l'interaction avec le cholestérol (Di Scala et al. 2013). Il serait donc intéressant de connaître les effets de cette mutation *in cellulo* sur la sécrétion de peptides amyloïdes.

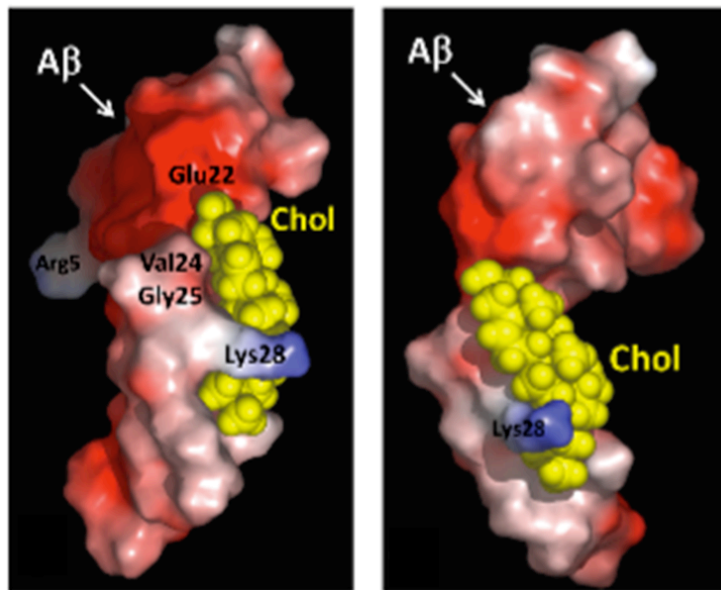


Figure 55 : Modélisations moléculaires de l'interaction entre le peptide A β (en rouge) et le cholestérol (en jaune). Les différents modèles de surface sont représentés sur les figures de droite et gauche. La chaîne latérale de la lysine 28 entoure le cholestérol dans une configuration analogue à un « bras ». Figure modifiée de Di Scala *et al.* 2013.

4.2 Les mutants du SLC modulent la sécrétion de peptides amyloïdes sans affecter le clivage ϵ de l'APP par la γ -sécrétase

4.2.1 La mutation familiale

Nos résultats concernant la mutation italienne E22K sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature. Nous avons montré une diminution significative d'A β 42 extracellulaire mais pas d'A β 40 dans des cellules HEK293T transfectées avec ce mutant (Nilsberth et al. 2001b). De plus, une étude montre qu'il n'y a pas de changement de l'activité de la γ -sécrétase pour le

mutant E22K (Tian et al. 2010) ce que nous confirmons par le dosage des taux d'AICD mesurés par western blot qui ne montre pas de différence de clivage global de l'APP par les sécrétases α , β et γ . Nous avons également montré que cette mutation induit une diminution des taux d'A β >28 sécrétés par rapport à l'APPwt. La mutation italienne E22K tout comme la mutation allemande (Dutch) E22Q se trouvent au milieu de la séquence du peptide amyloïde et causent des angiopathies amyloïdes cérébro-vasculaire (AAC) (Wattendorff et al. 1982; Luyendijk and Bots 1986; Panegyres et al. 2005). La mutation Dutch affecte la structure du peptide engendrant la formation de fibrilles beaucoup plus rapidement que la mutation Italienne (Miravalle et al. 2000; Baumketner, Krone, and Shea 2008), mais également d'oligomères (Grant et al. 2007). Nous pouvons donc supposer que la mutation italienne induit un changement de conformation de l'APP favorisant probablement l'accumulation intracellulaire de peptides conduisant à la formation de fibrilles et/ou d'oligomères sans modification de l'endocytose de ce mutant (Figure 56). Cette modification de conformation pourrait probablement favoriser leur rétention et leur agrégation au niveau vasculaire ce qui conduirait à des hémorragies cérébrales. Bien que le dosage MSD ne révèle pas cette accumulation intracellulaire, il est possible que l'agrégation des peptides empêche la détection par l'anticorps 6E10. Il aurait été intéressant de procéder à la détection d'oligomères par western blot dans les lysats cellulaires des cellules exprimant cette mutation pour vérifier cette hypothèse. En conclusion, la mutation E22K nous montre que la diminution de la sécrétion d'A β 42 n'est pas forcément protectrice, puisque cette mutation correspond à une forme familiale de la maladie.

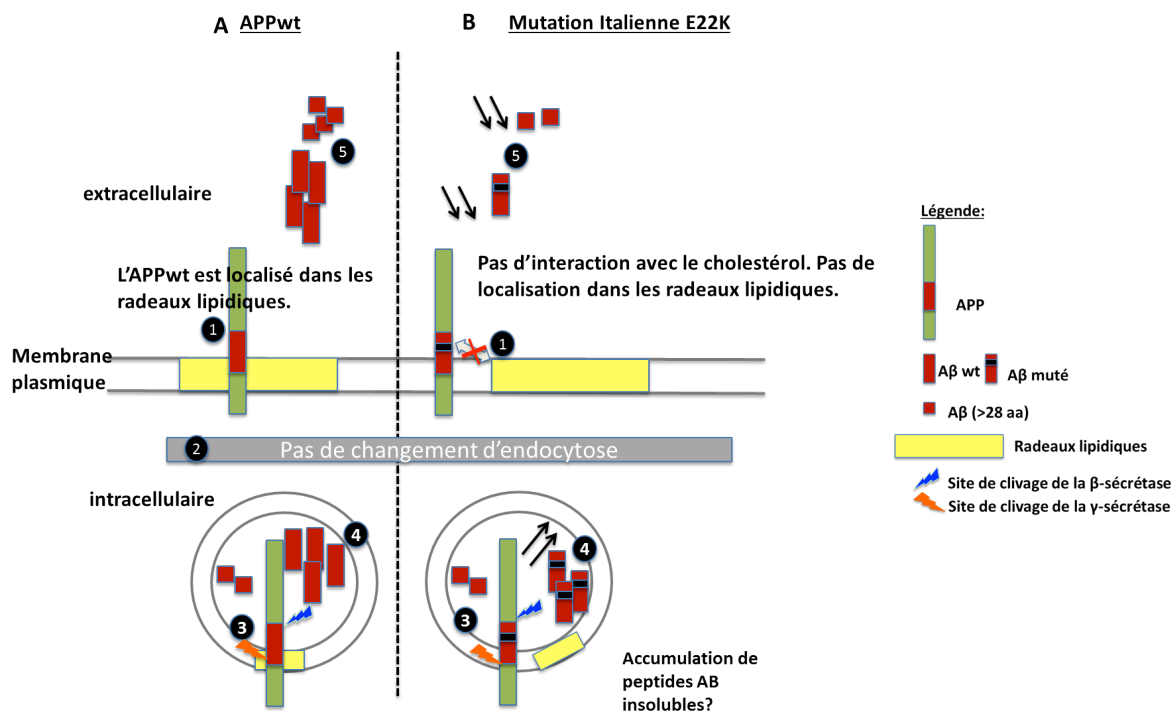


Figure 56 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).

L'APPwt transmembranaire (A, en vert) se trouve dans les radeaux lipidiques (en jaune) (**étape 1**) contrairement au mutant E22K qui se trouve en dehors des radeaux lipidiques (B). L'APPwt, tout comme le mutant E22K, est endocyté (**étape 2**) et clivé dans les endosomes par la β-sécrétase puis la γ-sécrétase (**étape 3**). Ce clivage aboutit à la production de peptides intracellulaires (**étape 4**) et à la sécrétion de peptides (**étape 5**) Aβ40, Aβ42 et Aβ>28 (en rouge).

4.2.2 Les mutants juxtamembranaires

D'autres études se sont intéressées aux mutants juxtamembranaires, en particulier la sérine en position 26 de l'Aβ a été étudiée par expression transitoire dans des cellules HEK293 et des cellules de neuroblastome H4 (Ren et al. 2007; Kukar et al. 2011). Nous avons montré une diminution significative de la sécrétion d'Aβ42 sans modification de la sécrétion d'Aβ40 par le mutant juxtamembranaire S26A. Nos travaux et les deux études portant sur cette mutation présentent des différences qui résident d'une part sur la mutation choisie avec une mutation de la sérine en leucine (Ren et al. 2007), un acide aminé beaucoup plus hydrophobe que l'alanine et d'autre part sur le fait que nous avons transfecté ces cellules avec l'APPMCherry et non pas C99. Ces études montrent par dosage ELISA une diminution de 50% et 25% (Ren et al. 2007 ; Kukar et al. 2011 respectivement) des taux d'Aβ40 sécrétés dans les cellules HEK293 exprimant le plasmide C99-GVP (protéine de fusion générée à partir d'un ADNc codant pour les domaines de liaison/transactivation d'ADN Gal4/VP16 (GVP), inséré dans le plasmide

contenant C99) portant la mutation S26L par rapport aux cellules exprimant le plasmide C99-GVP wt.

De plus, le dosage ELISA à l'aide du kit IBL a révélé une augmentation significative du taux d'A β >28 extracellulaire ce qui signifie que cette mutation entraîne une augmentation de la sécrétion de peptides courts (entre 28 et 38 acides aminés). D'autre part, nous avons observé une augmentation de la colocalisation de ce mutant dans les endosomes précoces, ce qui signifie qu'il est probablement plus endocyté. Une augmentation de l'endocytose de ce mutant nous laisserait supposer une augmentation de la sécrétion de peptides amyloïdes ce que nous démontrons avec l'augmentation des peptides A β >28. Nous avons donc probablement un décalage du clivage du mutant par la γ -sécrétase, augmentant les formes courtes d'A β . Cependant contrairement à ces deux études, nous n'obtenons pas de diminution significative d'A β 40 dans les cellules transfectées avec ce mutant.

Les plus fortes diminutions d'A β 40 et 42 extracellulaires sont retrouvées pour les mutants juxtamembranaires K28A, K28E, S26K28/AA. Les mutants K28A et K28E entraînent une diminution de 89% et 68% respectivement d'A β 40 sécrété, et une diminution de 83% et 86% d'A β 42 sécrété. Deux études montrent également des baisses très importantes des taux d'A β 40 et 42 sécrétés dans des lignées de cellules de neuroblastomes H4 exprimant stablement l'APP portant les mutations K28A et K28Q (Kukar et al. 2011)) et des HEK293T transfectées avec les mutants K28E (Page et al. 2010). Parallèlement, les auteurs montrent que la diminution des taux d'A β 40 et 42 par les mutants K28A et K28Q est due à un décalage du clivage de la γ -sécrétase conduisant à la formation de peptides plus courts mesurés par spectrométrie de masse (majoritairement A β 33 et A β 34 pour K28A ; A β 37 et A β 33 pour K28E) (Page et al. 2010; Kukar et al. 2011; Jung, Ran, et al. 2014). Nos résultats confirment cette hypothèse et montrent une augmentation de la sécrétion de peptides A β >28, ce qui signifie que nous avons une augmentation de peptides avec une taille inférieure à 38 acides aminés. Néanmoins le kit IBL utilisé ne nous permet pas de savoir quelles sont les tailles exactes de ces formes courtes d'A β qui augmentent. La très légère diminution des taux de CTFs pour le mutant K28A n'explique pas les très faibles taux d'A β 40 et 42. Les taux d'AICD mesurés par western blot ne révèlent aucune différence du clivage de l'APP par α , β et γ -sécrétase dans l'ensemble. Par déduction, nous avons conclu qu'il n'y avait pas de différence du clivage de la γ -sécrétase. En conclusion, nous avons montré une augmentation des peptides de courtes tailles sans modification du clivage de la γ -sécrétase et sans différence

de colocalisation des mutants K28A et K28E dans les endosomes précoces (Figure 57). On peut donc supposer que ces mutations modifient la conformation de l'APP ce qui engendre un décalage du clivage des sécrétases, entraînant la formation de peptides A β plus courts.

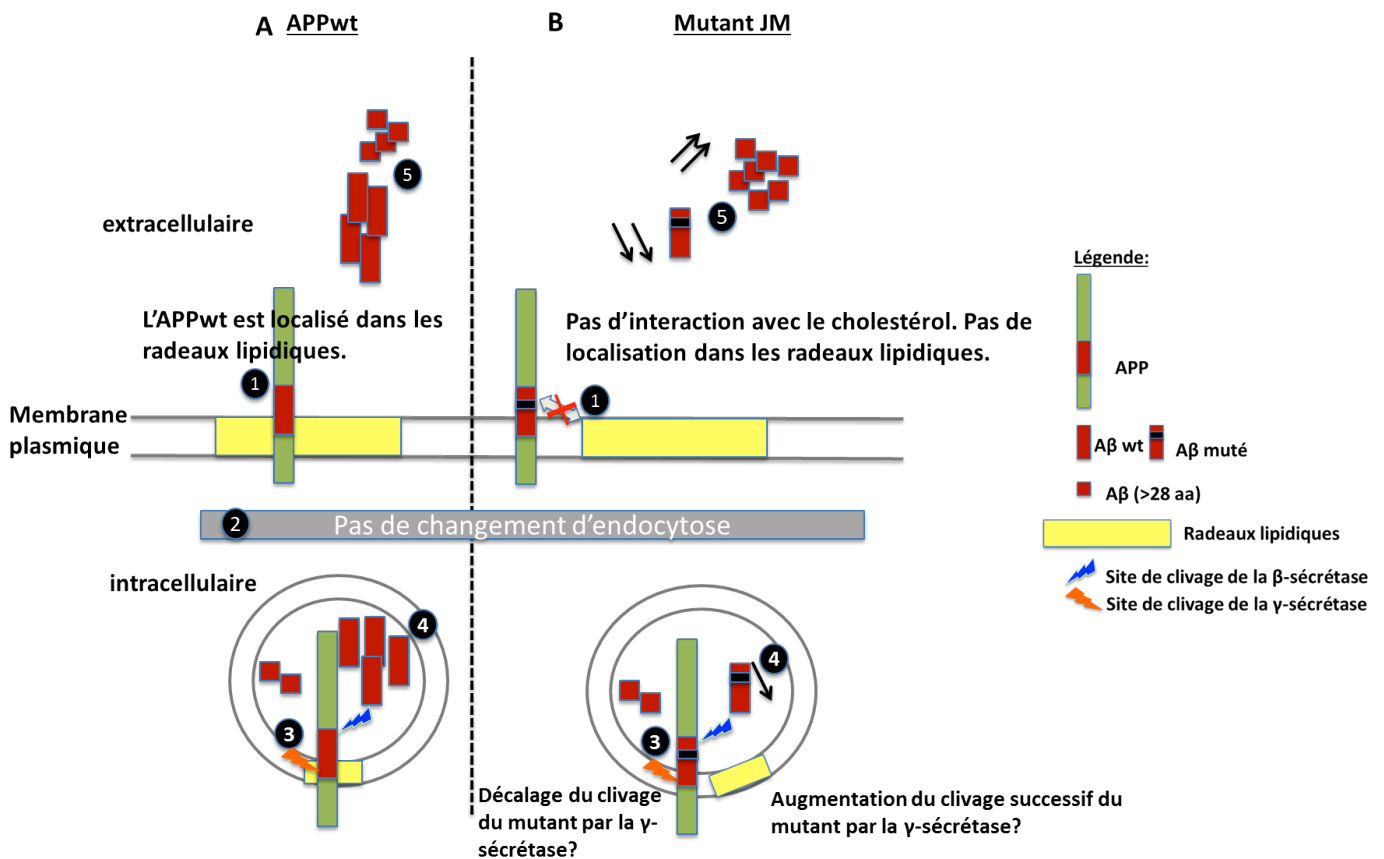


Figure 57 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).

L'APPwt transmembranaire (**A**, en vert) se trouve dans les radeaux lipidiques (en jaune) (**étape 1**) contrairement aux mutants juxtamembranaires qui se trouvent en dehors des radeaux lipidiques (**B**). L'APPwt, tout comme les mutants juxtamembranaires, est endocyté (**étape 2**) et clivé dans les endosomes par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase (**étape 3**). Ce clivage aboutit à la production de peptides intracellulaires (**étape 4**) et à la sécrétion de peptides (**étape 5**) A β 40, A β 42 et A β >28 (en rouge).

Ce décalage du clivage pourrait s'expliquer par le fait que la lysine chargée positivement pourrait interagir avec les phospholipides de la membrane chargés négativement et empêcher l'enfoncement de l'APP dans la membrane. La lysine 28 est d'autant plus importante dans l'interaction avec le cholestérol (Di Scala et al. 2013), que sa mutation en alanine engendrerait une suppression de la charge positive, permettant à l'APP de s'enfoncer dans la membrane. Cela entraînerait un décalage du clivage du mutant par la γ -sécrétase, la formation de peptides plus courts A β 33 et A β 34 (Kukar et al. 2011), et une diminution d'A β 42 libéré. La mutation

K28E engendrerait une inversion de charge qui déstabiliserait la structure hélicoïdale de la partie transmembranaire de l'APP et perturberait le clivage des sécrétases, avec un effet du décalage moins important que pour le mutant K28A (majoritairement A β 37 et A β 33) (Jung, Ran, et al. 2014).

L'autre possibilité serait que le cholestérol soit un modulateur de l'activité de la γ -sécrétase. La mutation empêcherait l'interaction de l'APP avec le cholestérol, ce qui laisserait l'espace libre pour un clivage successif en plusieurs étapes de la γ -sécrétase : on augmenterait la « processivité » de la γ -sécrétase. Cette seconde hypothèse a également été proposée par Joo In Jung et al. (Figure 58). À partir des peptides A β 48 générés par la γ -sécrétase, nous aurions la libération de peptides A β 45, A β 42 et A β 38 (en bleu sur le schéma figure 58) ; et à partir des peptides A β 49, la libération des peptides A β 46, A β 43 et A β 40 (en rose sur le schéma figure 58).

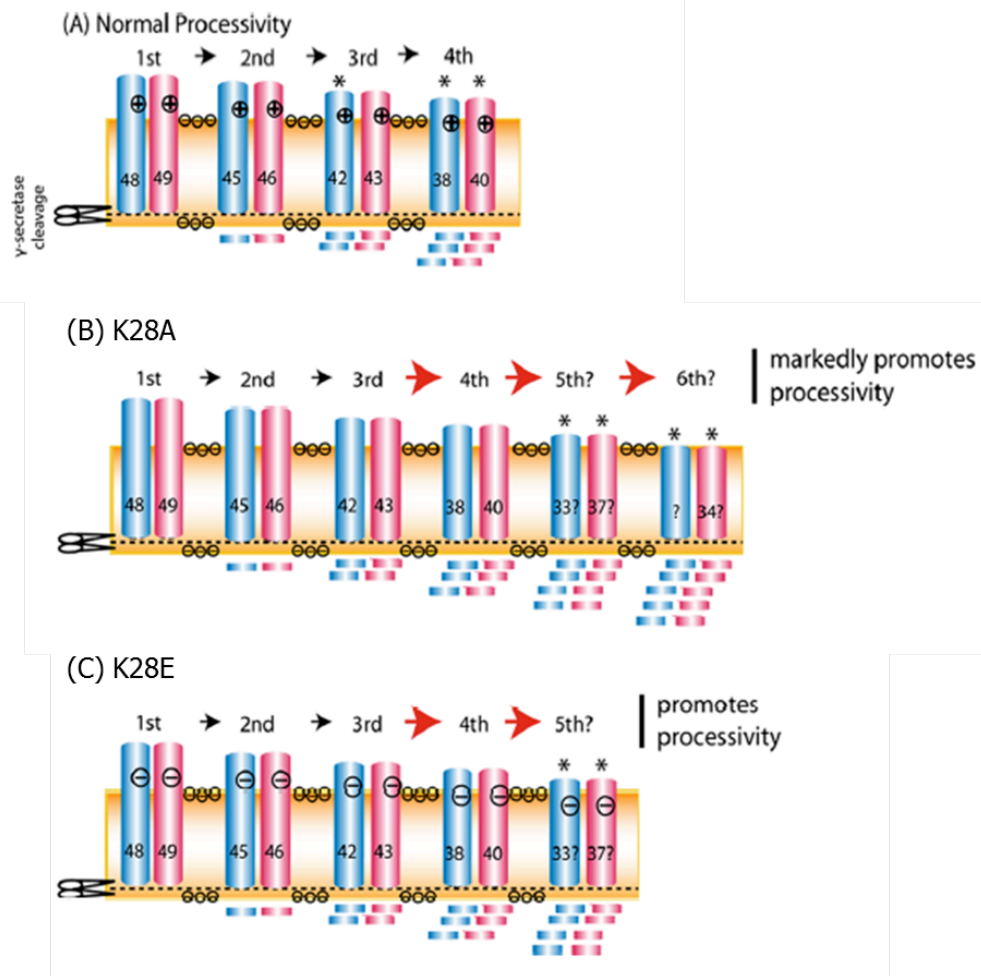


Figure 58 : Modèle proposé de la processivité de la γ -sécrétase basé sur la suppression de charge ou l'inversion de charge de la lysine 28.

A : Les produits majeurs issus du clivage de la γ -sécrétase A β 48 et A β 49 sont représentés en bleu et en rouge respectivement. Chaque fragment cytosolique représente les produits de clivage tri ou tétra peptidiques. Les produits de clivage A β 48 et A β 49 subissent jusqu'à quatre cycles de clivage. **B** : La suppression de charge augmente la processivité de la γ -sécrétase et permet de générer jusqu'à 5 ou 6 cycles de clivages aboutissant aux formes A β 33, A β 34 et A β 37. **C** : L'inversion de la charge positive par une charge négative augmente la processivité de la γ -sécrétase. L'acide aminé chargé négativement pourrait ne pas interagir avec les phospholipides de la membrane, conduisant à une plus grande flexibilité verticale de la protéine dans la membrane plasmique (figure modifiée à partir de Joo in Jung et al 2014).

Nous pouvons également supposer que nous avons une combinaison de ces deux mécanismes à savoir un décalage du clivage dû à la position des mutants juxtamembranaires dans la membrane (diminution d'A β 42) mais également un nombre de cycle de clivage augmenté par la γ -sécrétase (augmentation des peptides courts) (Figure 59). Le mutant K28A s'enfonce dans la membrane et permet à la γ -sécrétase de cliver plus haut dans la membrane libérant les formes majoritaires A β 33 et A β 34 (Kukar et al. 2011; Jung, Ran, et al. 2014) (flèches rouges en gras, figure 59B). Le mutant K28E a un effet moins sévère sur l'enfoncement de la protéine dans la membrane dû à l'inversion de charge avec la libération des formes

majoritaires d'Aβ37 et Aβ33 (Jung, Ran, et al. 2014) (figure 59C, flèche rouge en gras pour la forme majoritaire Aβ37). Enfin les mutants transmembranaires, révèlent par spectrométrie de masse la libération des formes d'Aβ37, 38, 39, 40 et 42 (Page et al. 2010). De plus, le mutant G29A révèle de plus grandes proportions d'Aβ40 et 42 sécrétés par rapport aux mutant K28A et K28E (Jung, Ran, et al. 2014), ce qui indiquerait que nous aurions une inhibition de la « processivité » de la γ-sécrétase : la γ-sécrétase effectuerait moins de clivages successifs pour les mutants transmembranaires (Figure 59D) mais sans affecter le clivage ε puisque nous n'avons pas de différence des taux d'AICD.

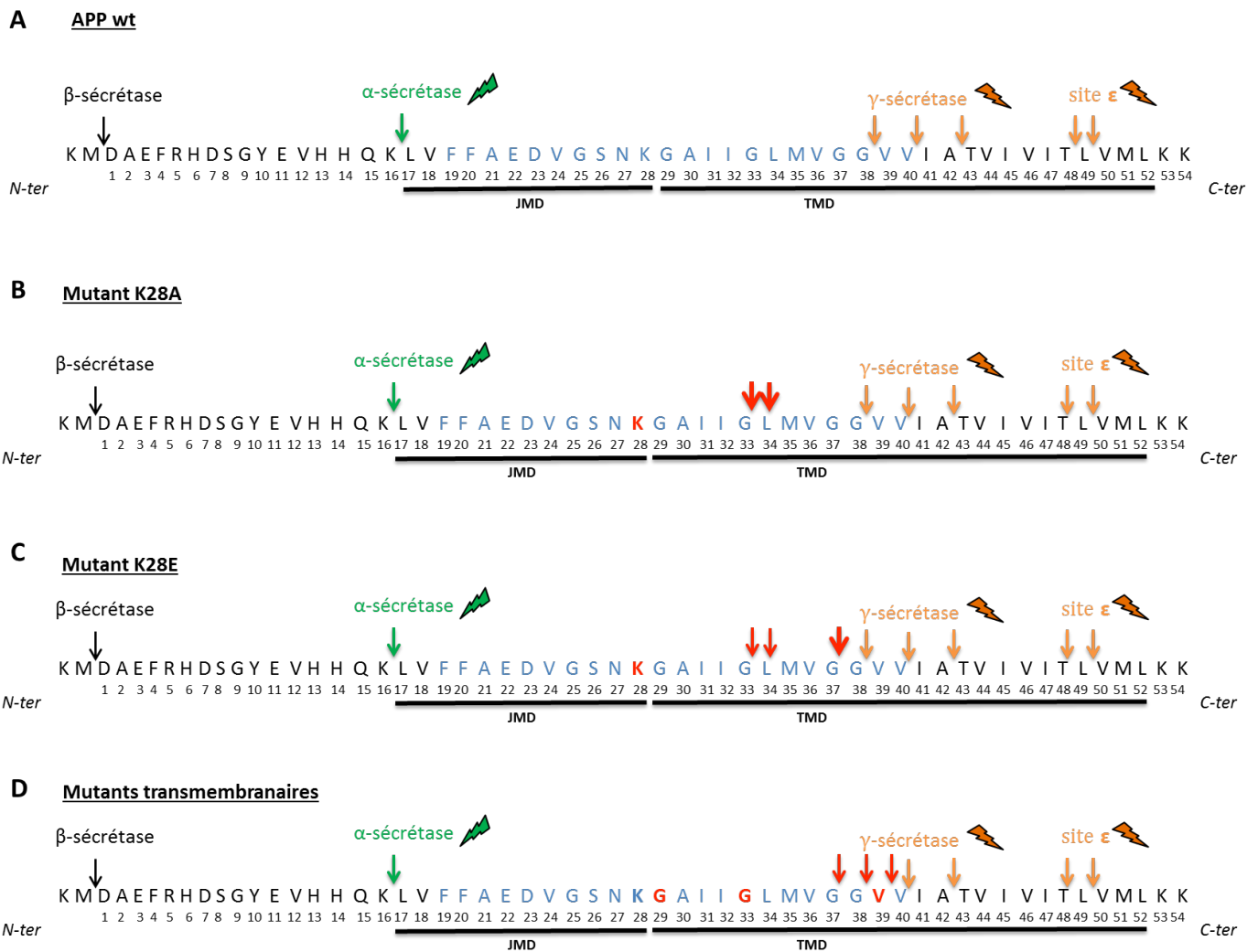


Figure 59 : Modèle de clivages successifs des mutants par la γ-sécrétase.

A : Clivage en orange de l'APPwt par la γ-sécrétase au site ε (pour la libération de l'AICD), puis aux sites conduisant à la libération des peptides Aβ38, Aβ40 et Aβ42. **B**, **C** et **D** : Les flèches rouges indiquent les clivages des peptides courts (à partir des mutants K28A, K28E et transmembranaires) et les flèches rouges en gras indiquent les tailles d'Aβ majoritaires libérés. Le SLC et les acides aminés mutés sont représentés en bleu et rouge respectivement. Le site de clivage par l'α-sécrétase est indiqué en vert.

Le double mutant S26K28/AA présente une diminution des taux d'A β 40 et A β 42 extracellulaires d'environ 90% et 81% respectivement. Nous avons pu voir que la mutation K28A permet à elle seule de diminuer ces taux de façon similaire à ceux obtenus avec le double mutant S26K28/AA. Cette double mutation n'a pas été étudiée dans la littérature, en revanche Ren et al. ont étudié le motif G25-S26-N27-K28 muté en S25-L26-S27-S28 (Ren et al. 2007). Les auteurs montrent que le mutant GSNK/SLSS engendre une diminution des taux d'A β total et d'A β 40 extracellulaires similaires à ceux obtenus avec le mutant simple K28S. Cette étude, tout comme nos travaux, montrent que la lysine 28 juxtamembranaire est cruciale pour la liaison de l'APP avec le cholestérol mais également importante dans la sécrétion de peptides amyloïdes.

4.2.3 Les mutants transmembranaires

Les glycines transmembranaires ont fait l'objet de plusieurs études du fait de leur implication dans la dimérisation de l'APP. Les glycines sont fréquemment retrouvées dans les hélices transmembranaires (Lemmon et al. 1992) et les motifs GxxxG sont connus pour être des motifs de dimérisation.

Dans notre étude, les mutants transmembranaires G29A et G29G33/AA diminuent de manière très importante les taux d'A β 40 et d'A β 42 sécrétés. Le mutant G33A diminue les taux d'A β 40 mais pas 42 extracellulaires. De plus, les mutants G33A et V39A diminuent également les taux d'A β 40 intracellulaires. Nous avons montré que ces quatre mutants transmembranaires diminuent les taux d'A β >28 sécrétés.

Bien que le mutant G29A soit le seul de nos mutants transmembranaires à diminuer significativement ces taux d'A β >28, les autres mutants présentent une tendance à la diminution de ces taux. Ce mutant ne présente pas de différence de colocalisation dans les endosomes précoces. Cette mutation pourrait engendrer des diminutions des clivages successifs générés par la γ -sécrétase sans modification de l'endocytose de ce mutant. Cependant, ces analyses de colocalisation ont été réalisées sur une seule expérience. Il serait donc important de reproduire ces résultats par la suite.

Une étude a montré que les mutations en alanine effectuées au niveau de ces glycines transmembranaires atténuent la dimérisation de l'APP. En effet, le mutant G33A atténue la

dimérisation plus efficacement que le mutant G29A (Munter et al, 2007), et la double mutation en alanine sur les deux glycines a un effet additif sur l'abolition de la dimérisation (Munter et al 2007). Nous pourrions supposer que les mutations diminueraient la dimérisation de l'APP et par conséquent diminueraient le clivage et la sécrétion de peptides amyloïdes. Cependant plusieurs études montrent que la dimérisation n'influe pas sur la production de peptides amyloïdes (So et al. 2013; Jung, Premraj, et al. 2014; Decock et al. 2015). Les résultats sur la production de peptides amyloïdes obtenus à partir de l'expression de ces mutants sont contradictoires d'une étude à l'autre et ne confirment pas forcément nos résultats. En effet, les simples mutants G29A et G33A n'ont pas d'effet sur les taux d'Aβ40 extracellulaires, en revanche les taux d'Aβ42 subissent des diminutions importantes de 67% et 60% (Munter et al 2007). Le double mutant G29G33/AA diminue les taux d'Aβ40 et 42 extracellulaires. Une autre étude montre que le double mutant transmembranaire G29A/G33A ne modifie pas les taux d'Aβ extracellulaires (Kienlen-Campard et al 2008). L'étude du domaine transmembranaire de l'APP est d'autant plus compliquée que les résultats obtenus sur la sécrétion de peptides amyloïdes et sur la dimérisation ou l'oligomérisation diffèrent selon la mutation effectuée (glycine en alanine, en leucine ou isoleucine). Néanmoins, nous pouvons émettre l'hypothèse que les glycines transmembranaires ne sont pas essentielles pour l'interaction avec le cholestérol. En effet, Di Scala et al. montrent que la glycine 29 mutée en alanine (tout comme dans nos travaux) a très peu d'effet sur l'interaction avec le cholestérol. De plus nos résultats, montrent des diminutions de la sécrétion de peptides amyloïdes beaucoup moins importantes que celles observées avec d'autres mutants (tel que la lysine 28 par exemple). Ainsi nous pouvons supposer que la diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes que nous observons dans nos expériences est probablement due à une inhibition de la capacité de la γ -sécrétase à effectuer des clivages successifs de l'APP.

Pour le double mutant G29G33/AA, nous pouvons mettre en relation nos résultats obtenus avec ceux de l'étude parue en 2008 avec le double mutant G29G33/LL (Kienlen-Campard et al. 2008). En effet, nous avons montré qu'il n'y a probablement pas de différence de la localisation subcellulaire du double mutant G29G33/AA, que les taux de fragments solubles sAPPβ restent inchangés et que les taux d'Aβ40 et 42 diminuent drastiquement. Les mutations en alanine engendreraient donc une diminution du clivage successif de ce mutant par la γ -sécrétase mais sans affecter les taux d'AICD produits tout comme pour le mutant G29G33/LL étudié dans Kienlen-campard et al. (2008)

Nous avons montré une très légère diminution du clivage de l'APP par l' α ou de la β -sécrétase avec le mutant transmembranaire V39A (et le mutant juxtamembranaire K28A). Il a été difficile de distinguer le clivage amyloïdogénique du clivage non-amyloïdogénique par western blot. C'est la raison pour laquelle j'ai procédé au dosage des sAPP α et sAPP β par MSD. Les résultats ne présentent aucune différence des taux de sAPP sécrétés par les mutants. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les taux de sAPP sécrétés ont été normalisés par les taux de transfection et présentent une grande variabilité. Ces résultats ne nous permettent donc pas de dire si cette légère diminution des CTFs est liée au clivage de l' α ou de la β -sécrétase. Les westerns blots réalisés sur les lysats de cellules HEK293T transfectées avec les différents mutants du SLC sans traitement au DAPT n'ont révélé aucune différence des taux d'AICD quelle que soit la mutation effectuée. Cependant, dans cette expérience, en analysant les taux AICD en absence de DAPT on analyse le clivage de toutes les sécrétases (α , β et γ) (Figure 60).

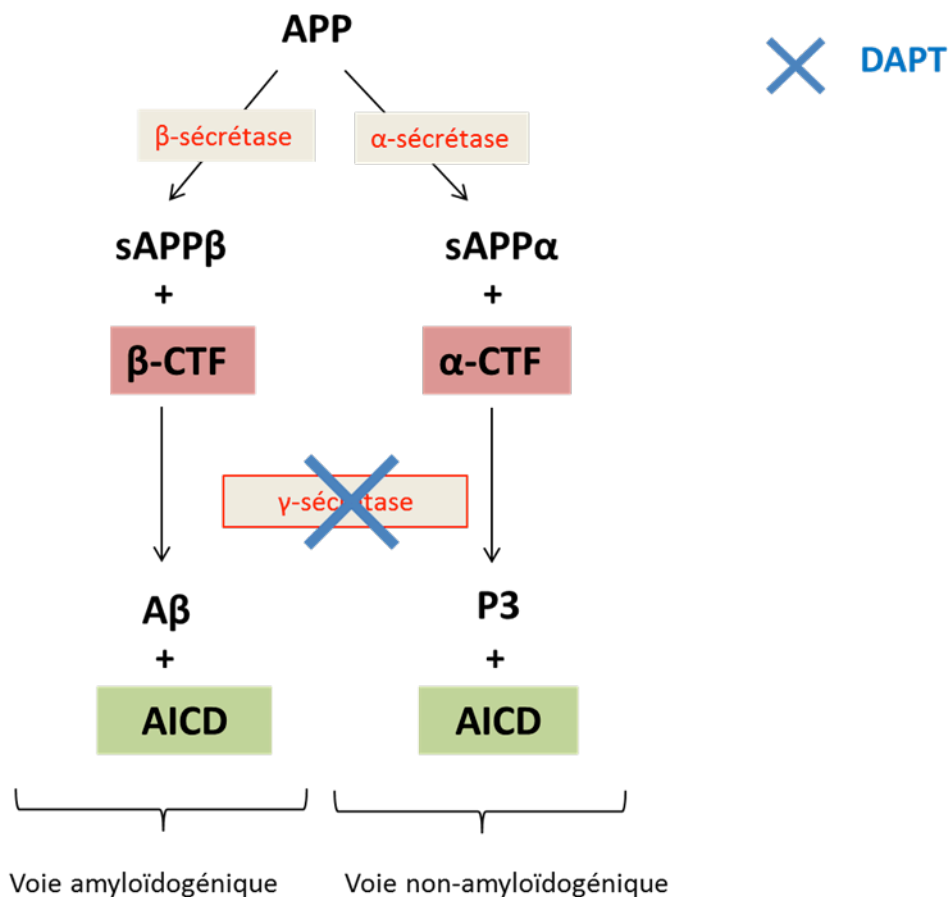


Figure 60 : Voies de clivages amyloïdogénique et non amyloïdogénique de l'APP. L'APP est clivée par la β ou l' α -sécrétase libérant ainsi dans le surnageant des cellules les fragments solubles sAPP β et sAPP α . Le DAPT (en bleu) inhibe l'activité de la γ -sécrétase, accumulant ainsi dans les cellules les fragments C-terminaux β -CTF et α -CTF.

La γ -sécrétase cliverait normalement dans un premier temps libérant l'A β 40 et 42 et l'AICD quelle que soit la mutation effectuée, puis à partir de l'A β 42 ou 40 généré on aurait plusieurs clivages aboutissant à la formation de peptides courts (Figure 59). Les mutants juxtamembranaires permettraient donc l'inhibition de l'interaction avec le cholestérol, aboutissant à un décalage du site de clivage de l'APP par la γ -sécrétase et à une augmentation de peptides courts A β >28 alors que les mutants transmembranaires engendreraient un changement de conformation de l'APP transformant C99 en mauvais substrat pour la γ -sécrétase ce qui diminuerait la processivité de la γ -sécrétase, et par conséquent aboutirait à une diminution de la production de petits peptides mais aussi d'A β 40 et 42 (Figure 61).

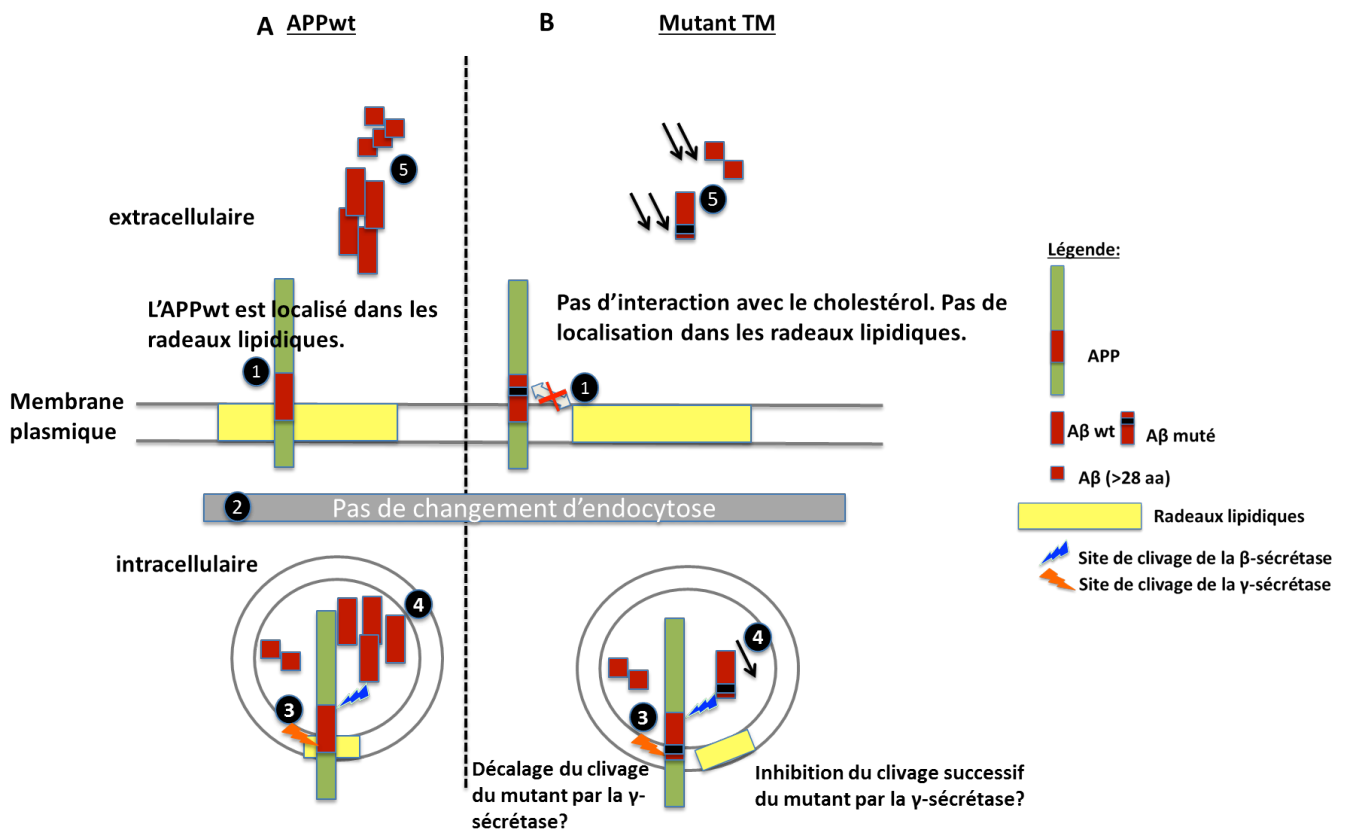


Figure 61 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).

L'APPwt transmembranaire (**A**, en vert) se trouve dans les radeaux lipidiques (en jaune) (**étape 1**) contrairement aux mutants transmembranaires qui se trouvent en dehors des radeaux lipidiques (**B**). L'APPwt, tout comme les mutants transmembranaires, est endocyté (**étape 2**) et clivé dans les endosomes par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase (**étape 3**). Ce clivage aboutit à la production de peptides intracellulaires (**étape 4**) et à la sécrétion de peptides (**étape 5**) A β 40, A β 42 et A β >28 (en rouge).

En conclusion (Figure 62), nous avons montré que la sécrétion de peptides amyloïdes dépend étroitement du SLC et que ces effets sont probablement dus à un décalage des sites de clivage des sécrétases ou bien à une modulation de la « processivité » de la γ -sécrétase (augmentée pour les mutants juxtamembranaires et diminuée pour les mutants transmembranaires). Le SLC pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans la MA. En utilisant des molécules capables d'entrer en compétition avec le cholestérol ou capables de cibler les acides aminés clés tels que la lysine 28 par exemple, nous pourrions réduire la sécrétion de peptides amyloïdes (exemple du bexarotène). Plus particulièrement, les mutants juxtamembranaires semblent être au centre de ce processus. Notre intérêt se porte sur le mutant K28A qui entraîne une diminution drastique des taux d'A β 40 et 42 avec un décalage du clivage de la γ -sécrétase (Kukar et al. 2011). *In vivo*, un modèle transgénique de souris exprimant l'APP muté K28A permettrait de comparer les déficits cognitifs ainsi que le taux de cholestérol cérébral avec des modèles de souris transgéniques de la MA (APP/PS1). À plus long terme, un screening de molécules permettrait d'identifier les molécules capables d'entrer en compétition avec le cholestérol et d'étudier la réduction de peptides amyloïdes sécrétés. Le kit IBL nous a permis de mesurer les taux d'A β >28 sécrétés avec une taille minimale de 28 acides aminés. Il aurait été intéressant de connaître la proportion d'A β 40 et 42 présente au sein de ces quantités d'A β >28 en soustrayant les quantités d'A β 40 et 42 mesurées par le kit MSD aux taux d'A β >28 mesurés par le kit IBL. Cependant, nous ne pouvons calculer cette proportion car les taux d'A β détectés par le kit IBL sont nettement inférieurs à ceux d'A β 40 et 42 détectés par le MSD. Cela pourrait être expliqué par le fait que ces deux kits présentent des méthodes de détection différentes avec des sites de détection et de capture différents (voir matériel et méthode). Enfin, la spectrométrie de masse nous permettrait de mesurer les différentes tailles de peptides sécrétés par les cellules exprimant les mutants du SLC (Page et al. 2010; Kukar et al. 2011; Jung, Ran, et al. 2014) et de connaître la proportion des différentes tailles de peptides au sein des taux d'A β >28 mesurés.

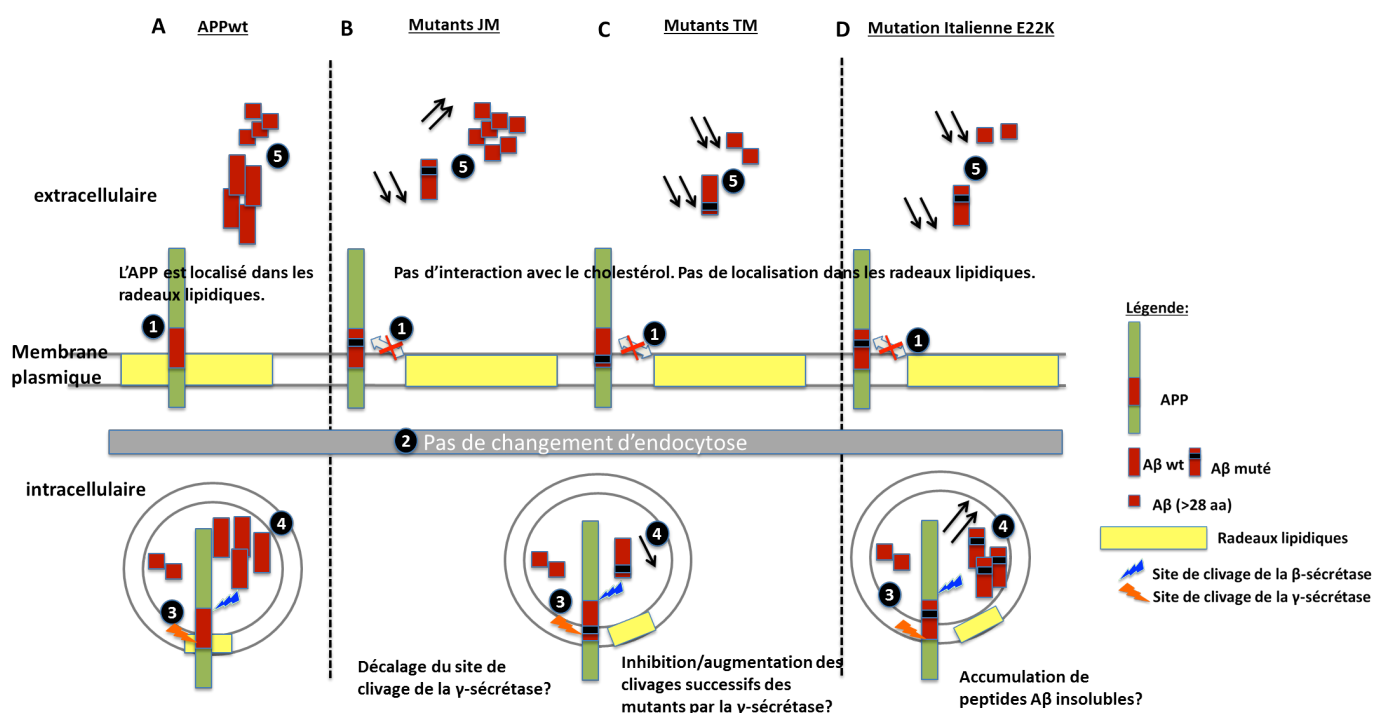


Figure 62 : Représentation schématique des mécanismes résultants de la mutation du site de liaison du cholestérol (SLC).

A : L'APPwt transmembranaire (en vert) se trouve dans les radeaux lipidiques (en jaune) (**étape 1**). L'APPwt est endocyté (**étape 2**) et clivé dans les endosomes par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase (**étape 3**). Ce clivage aboutit à la production de peptides intracellulaires (**étape 4**) et à la sécrétion de peptides (**étape 5**) A β 40, A β 42 (en rouge) et A β >28 (en bleu). **B, C, D** : Mécanismes d'endocytose, de clivage et de sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants juxtamembranaires, transmembranaires et la mutation familiale E22K.

4.3 La modulation du cholestérol membranaire influence la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC

Nous avons montré que le SLC module la sécrétion de peptides amyloïdes. Mon équipe a également montré que des variations de cholestérol membranaire modulent la sécrétion de peptides amyloïdes (J. C. Cossec et al. 2010; Marquer et al. 2014). Nous avons donc testé l'effet des mutations du SLC, qui abolissent la liaison de l'APP et du cholestérol, sur la modulation de la sécrétion de peptides amyloïdes par le cholestérol.

Les résultats attendus avec les mutants suite à une augmentation du cholestérol membranaire dans les cellules HEK exprimant les mutants, seraient que la sécrétion de peptides A β ne serait plus augmentée. À l'inverse un traitement à la MBCD seule permet de diminuer la concentration de cholestérol membranaire (Figure 64) dans les cellules exprimant l'APPwt. Nous montrons que la MBCD engendre 10 fois et 11 fois moins d'A β 40 et 42 respectivement

pour les cellules HEK293T exprimant l'APPwt contre 4 fois et 6 fois moins d'Aβ40 et 42 respectivement pour les cellules exprimant le mutant K28A. Les diminutions d'Aβ40 et 42 sont moins importantes pour le mutant K28A et s'expliquent par le fait que la mutation du SLC réduit considérablement la sécrétion d'Aβ en condition contrôlée.

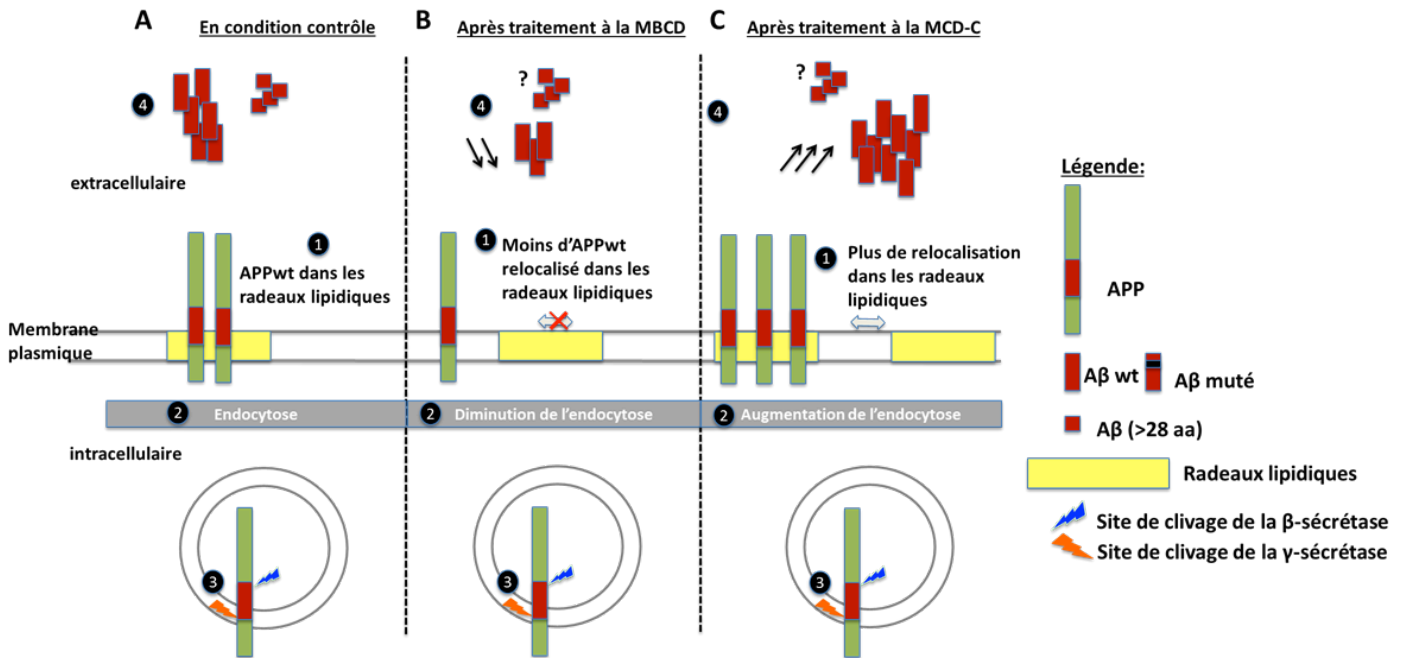


Figure 63 : Les effets de la modulation du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes dans les cellules transfectées avec l'APPwt.

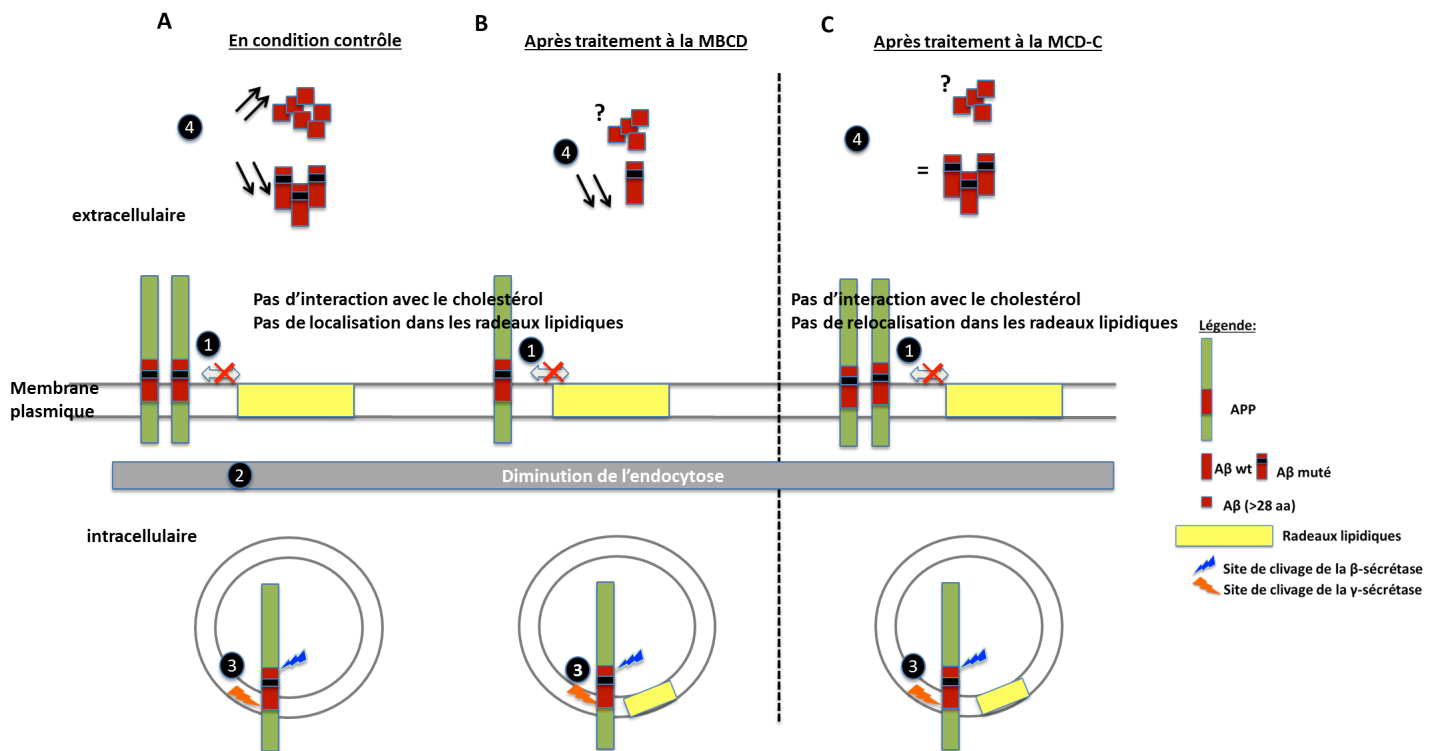


Figure 64 : Les effets de la modulation du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par l'APP muté K28A.

En condition contrôle (Figure 64A), nous avons montré que le mutant K28A diminue la sécrétion d'Aβ₄₀ et 42, et augmente la sécrétion de peptides de courte taille Aβ_{>28}. Nous pouvons supposer que la mutation K28A inhibe l'interaction de l'APP muté avec le cholestérol, ce qui n'entraînerait pas de relocalisation de l'APP muté dans les radeaux lipidiques contrairement à l'APPwt (Figure 63A). Après traitement à la MBCD (Figure 64B), nous avons une diminution du cholestérol membranaire (radeaux lipidiques en jaune réduits) et par conséquent une diminution de l'interaction entre l'APPwt et le cholestérol. La diminution de l'endocytose conduit à une diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes (J. C. Cossec et al. 2010). Cependant, il serait intéressant de connaître les effets de la déplétion du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides Aβ_{>28} (que ce soit pour l'APPwt ou l'APPmuté K28A) (Figure 64B et 64B). Après traitement au complexe MBCD-C (C), nous avons une augmentation du cholestérol membranaire conduisant à la relocalisation de l'APPwt dans les radeaux lipidiques. Cette augmentation du cholestérol membranaire conduit à une augmentation de l'endocytose de l'APP et à une augmentation de la sécrétion de peptides amyloïdes (J. C. Cossec et al. 2010; Marquer, Lévêque-Fort, and Potier 2012). De la

même manière que pour la condition **B**, il serait intéressant de connaître les effets de l'augmentation du cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides A β >28 (Figure 63C et 64C).

L'équipe a montré qu'un traitement au complexe MBCD-C engendre une augmentation de la sécrétion de peptides amyloïdes dans les HEK293T exprimant stablement l'APPmuté Swedish (J. C. Cossec et al. 2010). Ces résultats n'ont pas pu être reproduits dans les cellules HEK293T exprimant transitoirement les mutants du SLC. Nous pouvons supposer que la transfection perturbe fortement l'homéostasie des membranes plasmiques et par conséquent empêche l'insertion du complexe MBCD-C au sein des membranes. Pour pallier à ce problème, il aurait été judicieux de travailler sur des lignées stables HEK293T exprimant les mutants du SLC, ce qui permettrait d'effectuer le traitement sans avoir à transfecter les cellules. Ces travaux sont en cours sur un système microfluidique permettant la séparation de cellules uniques dans des nanogouttes et leur distribution dans des plaques de titration, ce qui permettrait de cloner les cellules HEK293T exprimant de manière stable l'APPmuté ou wt-mCherry. Nos expériences ont été réalisées sur des cellules HEK293T, cependant pour se rapprocher des conditions physiologiques il serait intéressant de réaliser ces expériences dans des neurones. La transfection étant peu efficace sur des cultures primaires de neurones, nous avons procédé à la synthèse de lentivirus exprimant l'APPwt-mCherry et le mutant APP K28E-mCherry, ce qui nous permettrait d'obtenir un bon taux d'expression de notre protéine.

4.4 Comment la liaison du cholestérol sur l'APP favorise la sécrétion de peptides amyloïdes et conduit à la MA ?

En comparant la position du site de clivage de l' α -sécrétase et celui du SLC, nous constatons que le site de clivage de l' α -sécrétase est très proche du SLC. Nous pouvons supposer que la liaison du cholestérol à l'APP empêche l' α -sécrétase de cliver. De plus, une étude montre que le clivage de la trypsine au niveau du site α est inhibé en présence de cholestérol (Marenchino et al. 2008). Il a été proposé que l'APP jouerait le rôle de senseur de cholestérol et régulerait la biosynthèse du cholestérol (Beel et al. 2008) (Figure 65).

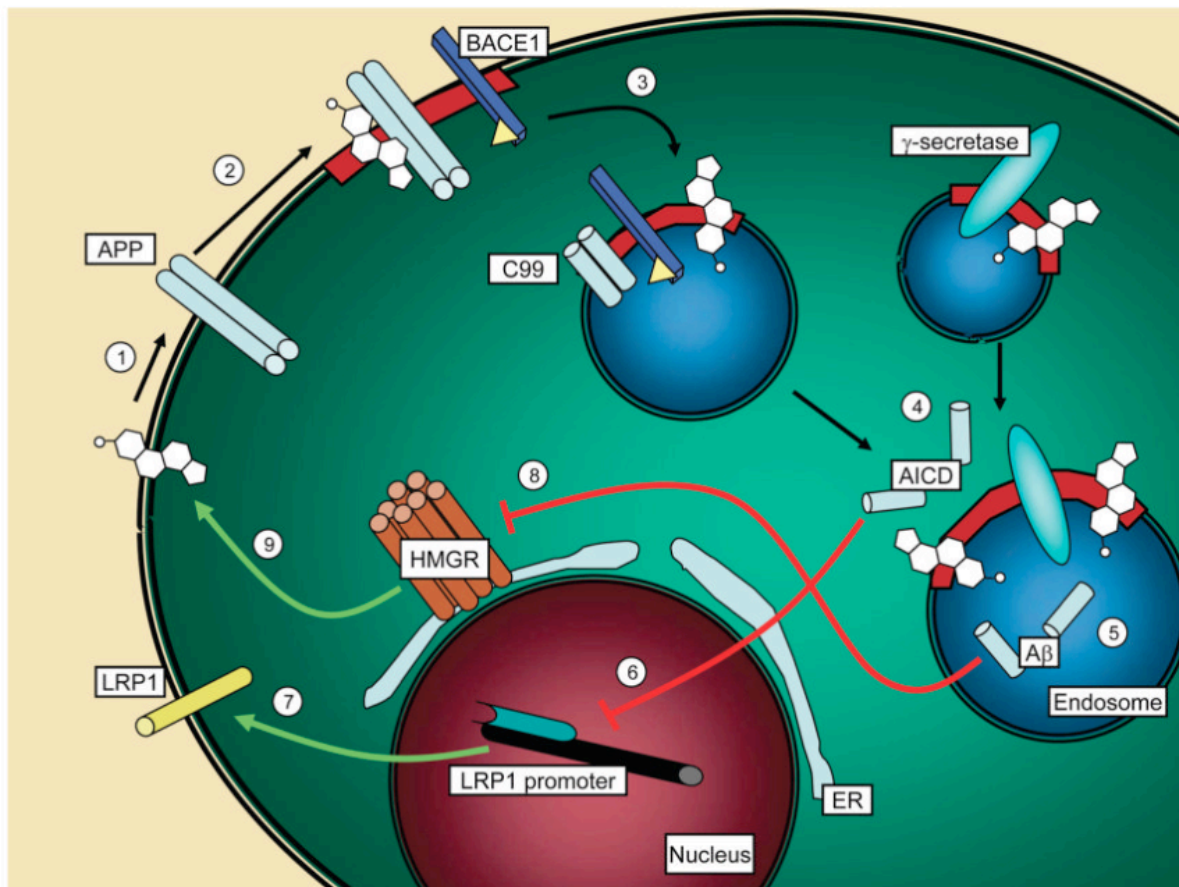


Figure 65 : Représentation schématique des effets des produits de clivages de l'APP sur le métabolisme du cholestérol (d'après Beel et al 2008).

L'excès de cholestérol à la membrane plasmique conduirait à une relocalisation de l'APP dans les radeaux lipidiques (**étape 2**). L'APP contenu dans les radeaux lipidiques serait internalisé dans les endosomes précoces où il subirait le clivage par la β et la γ -sécrétase, libérant le peptide amyloïde et le fragment AICD (**étape 3 et 4**). L'AICD est ensuite capable de diminuer la transcription des récepteurs LRP1, ce qui conduirait à la diminution du nombre de récepteurs LRP1 présents à la membrane plasmique (**étape 6**) (Q. Liu et al. 2007). Parallèlement, l'A β 40 inhiberait l'activité de la HMGR, enzyme limitante de la biosynthèse de cholestérol (Grimm et al. 2005). Nous avons donc deux mécanismes qui opèrent : une diminution de l'adsorption de cholestérol exogène par les récepteurs LRP1 et une synthèse endogène de cholestérol. Au final, l'interaction du cholestérol avec l'APP conduit à une diminution des taux de cholestérol cellulaire et l'APP serait donc un senseur de cholestérol. En effet, une étude démontre également que la surexpression de l'APP ou de C99 dans des cultures primaires de neurones (mais pas AICD) engendre une diminution de la synthèse de cholestérol, accompagnée d'une diminution de l'expression d'une famille de facteurs de transcription contrôlant l'homéostasie du cholestérol appelée « Sterol Response Element

Binding Proteins » (SREBP), et par conséquent de l'HMGCR (Pierrot et al. 2013). Ainsi l'APP contrôlerait les taux de cholestérol cellulaire.

La liaison de l'APP et du cholestérol semble donc être au cœur des mécanismes induisant la sécrétion de peptides amyloïdes. Les résultats obtenus ne nous permettent cependant pas d'émettre des conclusions quant aux mécanismes moléculaires engendrés par cette liaison.

4.5 Effets du génotype ApoE sur la sécrétion d'A β et l'expression de protéines intracellulaires

L'ApoE est le facteur génétique de risque majeur de développer la MA. Il est donc important de comprendre les mécanismes impliquant l'ApoE, le cholestérol et la production de peptides amyloïdes.

La sécrétion de peptides amyloïdes a été quantifiée par MSD sur les surnageants de neurones ApoE3 et ApoE4 knocked in. Les neurones ApoE4 produisent beaucoup plus d'A β 38, 40 et 42 que les neurones ApoE3 et cette production augmente avec le temps de culture. Nous avons pu voir que les neurones ApoE4 expriment de manière moins importante l'ApoE « full length » que les neurones ApoE3. Ceci est confirmé par une étude montrant que les neurones ApoE4 produisent plus de fragments neurotoxiques que les neurones ApoE3 (G. Li et al. 2009). De plus, nous avons montré que les neurones ApoE4 présentent également des taux élevés de la protéine tau, et tau-phosphorylée (2,6 et 2,2 fois plus respectivement). Ces résultats sont par ailleurs confirmés dans la littérature (G. Li et al. 2009). Il aurait été intéressant d'effectuer des co-cultures d'astrocytes ApoE3 et ApoE4 avec des neurones wt afin d'étudier les effets d'une modulation du cholestérol membranaire sur la production de peptides amyloïdes par les neurones en présence d'apolipoprotéines ApoE3 et ApoE4 provenant des cultures astrocytaires. Des analyses biochimiques et des marquages immunohistochimiques sur des cerveaux de souris ApoE3 et ApoE4 que nous avons collectés vont nous permettre de caractériser plus en détails ces génotypes.

Conclusion et Perspectives

5 Conclusion et perspectives

Mon hypothèse de travail était que les mutations du site de liaison du cholestérol pourraient abolir l'interaction entre l'APP et le cholestérol et par conséquent engendrer une diminution de la sécrétion de peptides amyloïdes. Les objectifs étaient donc d'analyser le SLC par RPS et d'étudier les effets des mutations sur le clivage des mutants par les sécrétases. Le but final est de connaître le rôle du SLC et du cholestérol dans la modulation de la sécrétion de peptides amyloïdes. Mes résultats révèlent l'importance de certains acides aminés présents dans le SLC et mettent en lumière une très forte baisse de la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC.

Dans un premier temps, nous avons validé pour la première fois par RPS l'existence du SLC et avons montré que les mutations F18S, F19S, S26A et K28D abolissent totalement l'interaction avec le cholestérol. Il serait intéressant de savoir si c'est l'ensemble des mutations qui abolit l'interaction avec le cholestérol ou bien si nous avons un effet individuel de ces mutations. Pour cela nous avons généré de nouveaux peptides et la chimie de surface de notre puce va être améliorée. Nous procéderons à la synthèse de peptides comportant des mutations simples afin de pouvoir tester l'implication de ces mutations dans l'interaction avec le cholestérol par la technique de RPS. De cette manière nous pourrions valider ou non l'effet des glycines transmembranaires G29 et G33 sur l'interaction avec le cholestérol par exemple.

Puis dans un second temps 3 types de mutants ont été générés pour affiner l'étude du SLC : les mutants juxtamembranaires, transmembranaires et la mutation familiale. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec ces mutants.

Nous avons montré que les mutations du SLC entraînent une diminution sévère de la sécrétion de peptides A β 40 et A β 42 dans les HEK293T (en accord avec plusieurs études Ren et al. 2007, Kukar et al. 2011, Page et al. 2010, Joo in jung et al 2014). Les dosages IBL ont révélé une augmentation des peptides A β >28 (entre 28 et 42 acides aminés) pour les mutants juxtamembranaires. Néanmoins, il serait intéressant de connaître quelles sont les tailles présentes au sein de ces peptides courts A β >28. Il faudrait pour compléter ces résultats mesurer par spectrométrie de masse les proportions de peptides courts A β 33, 34 et 37 présentes au sein de ces quantités d'A β >28 secrétés.

Nous souhaitons connaître les effets de ces mutations dans un modèle de culture cellulaire se rapprochant des conditions physiologiques, telles que les cultures primaires de neurones. Cependant, la transfection restant inefficace sur les neurones nous avons entrepris la production de lentivirus exprimant l'APPwt et le mutant K28A. De cette manière nous pourrions avoir un taux d'expression élevé de la protéine APPwt ou mutée, et cela nous permettrait de confirmer les résultats de sécrétion de peptides amyloïdes mais également d'étudier les effets d'une modulation de cholestérol membranaire sur la sécrétion de peptides amyloïdes par les mutants du SLC. En effet, deux études réalisées au sein de mon équipe ont montré qu'une modulation du cholestérol membranaire entraîne des changements sévères de sécrétion d'A β dans des cellules HEK293T et des cultures primaires de neurones (J. C. Cossec et al. 2010; Marquer et al. 2014). En effet, les neurones présentent une augmentation de la sécrétion d'A β 42 et une diminution de la sécrétion d'A β 38 (sans changement significatifs des taux d'A β 40) (Marquer et al. 2014). De plus des résultats préliminaires m'ont permis de montrer que la mutation K28A mime à elle seule les effets d'une déplétion de cholestérol membranaire avec une diminution drastique de la sécrétion de peptides amyloïdes. Ce qui confirme que c'est bien l'interaction entre l'APP et le cholestérol qui influence la sécrétion de peptides amyloïdes.

Une étude a montré que la surexpression de SREBP sur des souris triple transgéniques (APP/PS1 surexprimant SREBP) entraîne une accumulation accrue de cholestérol cérébral qui suffit à déclencher la synthèse et l'accumulation d'A β . Les cerveaux de ces souris révèlent une activation microgliale et une augmentation de la mort neuronale. Ces souris ont la particularité de développer des DNF contrairement aux souris transgéniques simples SREBP indiquant que l'augmentation de cholestérol seule n'est pas suffisante pour développer l'hyperphosphorylation de tau et son agrégation (Barbero-Camps et al. 2013). Il serait donc intéressant de savoir si les mutations du SLC (exemple du mutant K28A) parviendraient à inverser ces effets en utilisant un modèle transgénique similaire à celui de cette étude en utilisant l'APPmuté K28A.

Enfin, mon hypothèse est basée sur le fait que les mutants du SLC abolissent l'interaction de l'APP avec le cholestérol ce qui conduirait à une diminution de la localisation de l'APP dans les radeaux lipidiques. Nous pourrions valider cette hypothèse en étudiant la localisation des

mutants du SLC dans les radeaux lipidiques par des techniques biochimiques (ultracentrifugation et western blot). Une seconde possibilité serait d'étudier ce paramètre par la technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (SCF). Cette technique permet d'analyser les fluctuations de molécules fluorescentes diffusant à l'intérieur d'un très petit volume de l'ordre du femtolitre (Marquer, Lévêque-Fort, and Potier 2012). Les variations de l'intensité de fluorescence sont enregistrées en fonction du temps. Chaque enregistrement permet de calculer une fonction d'autocorrélation qui correspond à la probabilité qu'une protéine émettrice fluorescente présente à l'instant t_0 soit encore présente à l'instant t_1 dans le même point focal d'analyse. Ainsi, à la membrane, la molécule étudiée peut diffuser lentement (environnement dense en cholestérol de type « radeau lipidique ») ou plus rapidement (phase fluide de la membrane). Dans notre cas l'APP muté K28A devrait se trouver en dehors des radeaux lipidiques. La mise au point de cette technique a d'ores et déjà été entreprise par Catherine Marquer, post-doctorante au sein de mon équipe.

Une diminution de la localisation de l'APP muté dans les radeaux lipidiques devrait conduire à une diminution de l'endocytose de l'APP muté. L'objectif sera donc dans un second temps de traiter les neurones au cholestérol et de regarder l'effet sur l'endocytose de l'APP muté et son clivage en peptide amyloïde. Les techniques utilisées seront la quantification de la fluorescence internalisée par cryométrie en flux et la mesure des produits de clivage de l'APP par western blot et dosages ELISA (MSD, IBL).

Nous avons montré que la mutation italienne conduit à la diminution significative de la sécrétion de peptides amyloïdes A β 42, sans altérer le clivage de l'APP par la γ -sécrétase. Bien que cette mutation réduise la sécrétion de peptides amyloïdes elle reste délétère et induit une MA. Nous pourrions étudier la fibrillation et l'oligomérisation des peptides portant cette mutation par western blot dans notre modèle de cellules HEK ou dans les neurones. Il serait intéressant de pouvoir comparer la sécrétion de peptides amyloïdes et les effets du cholestérol sur celle-ci sur des cellules dérivées de patients atteints par la MA portant la mutation italienne.

Le cholestérol, interagissant avec le site de liaison présent sur la séquence de l'A β , est un modulateur de la sécrétion de peptides amyloïdes. Mais d'autres facteurs impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, comme l'ApoE, peuvent aussi jouer un rôle dans cette régulation. Afin de mieux comprendre les mécanismes reliant l'ApoE, et l'A β nous avons étudié dans un premier temps l'effet du génotype ApoE sur la sécrétion naturelle de peptides

amyloïdes par des neurones primaires issus de souris KI ApoE3 et ApoE4. Nous avons montré que les neurones ApoE4 sécrètent en plus grande quantité les peptides amyloïdes A β 38, 40 et 42 par rapport aux neurones ApoE3. Les neurones ApoE4 expriment plus fortement les protéines tau et phospho-tau, mais plus faiblement l'ApoE « full length » par rapport aux neurones ApoE3. Il aurait été intéressant d'étudier les effets d'une modulation du cholestérol membranaire sur la production de peptides amyloïdes par les neurones. Pour cela, nous pourrions mettre en place des co-cultures d'astrocytes ApoE3 et ApoE4 avec des neurones wt en présence d'apolipoprotéines ApoE3 et ApoE4 provenant des cultures astrocytaires après modulation du cholestérol membranaire. Mon équipe a montré que la synaptojanine, phosphatase surexprimant un phosphate aux molécules de phosphatidylinositol (4,5)- biphosphates (PIP2) pour former des phosphatidyl-4-phosphates (PIP), est impliquée dans l'endocytose et sa surexpression dans les cellules de neuroblastome est responsable du phénotype d'endosomes élargis (J.-C. Cossec et al. 2012). De plus, une étude montre dans les cerveaux de souris ApoE4 KI et dans les cerveaux de patients ApoE4 atteint de la MA que les taux de PIP2 sont réduits (Zhu et al. 2015). Il serait intéressant de connaître les taux d'expression de la synaptojanine en condition basale dans nos cultures primaires de neurones ApoE3 et ApoE4 et de voir si l'abolition de l'expression de la synaptojanine permet de réduire la sécrétion de peptides amyloïdes.

Ainsi, le SLC tout comme l'ApoE, régulent la sécrétion de peptides amyloïdes. Il serait intéressant de connaître les effets des mutations du SLC dans les neurones ApoE3 et ApoE4.

Bibliographie

6 Bibliographie

- Abe-Dohmae, Sumiko, Yuika Ikeda, Michinori Matsuo, Michi Hayashi, Kei-ichiro Okuhira, Kazumitsu Ueda, and Shinji Yokoyama. 2004. "Human ABCA7 Supports Apolipoprotein-Mediated Release of Cellular Cholesterol and Phospholipid to Generate High Density Lipoprotein." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (1): 604–11. doi:10.1074/jbc.M309888200.
- Abildayeva, Karlygash, Paula J Jansen, Veronica Hirsch-Reinshagen, Vincent W Bloks, Arjen H F Bakker, Frans C S Ramaekers, Jan de Vente, et al. 2006. "24(S)-Hydroxycholesterol Participates in a Liver X Receptor-Controlled Pathway in Astrocytes That Regulates Apolipoprotein E-Mediated Cholesterol Efflux." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12799–808. doi:10.1074/jbc.M601019200.
- Alonso, A C, T Zaidi, I Grundke-Iqbal, and K Iqbal. 1994. "Role of Abnormally Phosphorylated Tau in the Breakdown of Microtubules in Alzheimer Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (12): 5562–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8202528>.
- Alves da Costa, C., C. Sunyach, R. Pardossi-Piquard, J. Sevalle, B. Vincent, N. Boyer, T. Kawarai, N. Girardot, P. St. George-Hyslop, and F. Checler. 2006. "Presenilin-Dependent -Secretase-Mediated Control of p53-Associated Cell Death in Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience* 26 (23): 6377–85. doi:10.1523/JNEUROSCI.0651-06.2006.
- Alzheimer, A, R A Stelzmann, H N Schnitzlein, and F R Murtagh. 1995. "An English Translation of Alzheimer's 1907 paper, 'Über Eine Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde'." *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)* 8 (6): 429–31. doi:10.1002/ca.980080612.
- Amouyel, P, T Brousseau, J C Fruchart, and J Dallongeville. 1993. "Apolipoprotein E-Epsilon 4 Allele and Alzheimer's Disease." *Lancet (London, England)* 342 (8882): 1309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7901623>.
- Anderson, R, J C Barnes, T V P Bliss, D P Cain, K Cambon, H a Davies, M L Errington, et al. 1998. "Behavioural , Physiological and Morphological Analysis of a Line of Apolipoprotein E Knockout Mouse" 85 (1): 93–110.
- Ando, K, K I Iijima, J I Elliott, Y Kirino, and T Suzuki. 2001. "Phosphorylation-Dependent Regulation of the Interaction of Amyloid Precursor Protein with Fe65 Affects the Production of Beta-Amyloid." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (43): 40353–61. doi:10.1074/jbc.M104059200.
- Andrews-Zwilling, Y, N Bien-Ly, Q Xu, G Li, A Bernardo, S Y Yoon, D Zwilling, T X Yan, L Chen, and Y Huang. 2010. "Apolipoprotein E4 Causes Age-and Tau-Dependent Impairment of GABAergic Interneurons, Leading to Learning and Memory Deficits in Mice." *The Journal of Neuroscience* 30 (41): 13707–17. doi:10.1523/JNEUROSCI.4040-10.2010.Apolipoprotein.

- Arnold, S E, B T Hyman, J Flory, A R Damasio, and G W Van Hoesen. 1991. "The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease." *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)* 1 (1): 103–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1822725>.
- Arriagada, P V, J H Growdon, E T Hedley-Whyte, and B T Hyman. 1992. "Neurofibrillary Tangles but Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimer's Disease." *Neurology* 42 (3 Pt 1): 631–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1549228>.
- Bachmeier, Corbin, David Beaulieu-Abdelahad, Fiona Crawford, Michael Mullan, and Daniel Paris. 2013. "Stimulation of the Retinoid X Receptor Facilitates Beta-Amyloid Clearance across the Blood-Brain Barrier." *Journal of Molecular Neuroscience : MN* 49 (2): 270–76. doi:10.1007/s12031-012-9866-6.
- Baier, Carlos J, Jacques Fantini, and Francisco J Barrantes. 2011. "Disclosure of Cholesterol Recognition Motifs in Transmembrane Domains of the Human Nicotinic Acetylcholine Receptor." *Scientific Reports* 1: 69. doi:10.1038/srep00069.
- Ballard, Clive, Serge Gauthier, Anne Corbett, Carol Brayne, Dag Aarsland, and Emma Jones. 2011. "Alzheimer's Disease." *The Lancet* 377 (9770). Elsevier Ltd: 1019–31. doi:10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
- Baranger, Kévin, Yannick Marchalant, Amandine E. Bonnet, Nadine Crouzin, Alex Carrete, Jean Michel Paumier, Nathalie A. Py, et al. 2016. "MT5-MMP Is a New pro-Amyloidogenic Proteinase That Promotes Amyloid Pathology and Cognitive Decline in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (1): 217–36. doi:10.1007/s00018-015-1992-1.
- Barbero-Camps, Elisabet, Anna Fernández, Laura Martínez, Jose C. Fernández-Checa, and Anna Colell. 2013. "APP/PS1 Mice Overexpressing SREBP-2 Exhibit Combined A β Accumulation and Tau Pathology Underlying Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 22 (17): 3460–76. doi:10.1093/hmg/ddt201.
- Barrett, Paul J, Yuanli Song, Wade D Van Horn, Eric J Hustedt, M Johanna, Arina Hadziselimovic, Andrew J Beel, and Charles R Sanders. 2012. "NIH Public Access" 336 (6085): 1168–71. doi:10.1126/science.1219988.The.
- Basak, Jacob M., Philip B. Verghese, Hyejin Yoon, Jungsu Kim, and David M. Holtzman. 2012. "Low-Density Lipoprotein Receptor Represents an Apolipoprotein E-Independent Pathway of A β Uptake and Degradation by Astrocytes." *Journal of Biological Chemistry* 287 (17): 13959–71. doi:10.1074/jbc.M111.288746.
- Baumketner, Andrij, Mary Griffin Krone, and Joan-Emma Shea. 2008. "Role of the Familial Dutch Mutation E22Q in the Folding and Aggregation of the 15-28 Fragment of the Alzheimer Amyloid-Beta Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (16): 6027–32. doi:10.1073/pnas.0708193105.
- Beach, T G, R Walker, and E G McGeer. 1989. "Patterns of Gliosis in Alzheimer's Disease and Aging Cerebrum." *Glia* 2 (6): 420–36. doi:10.1002/glia.440020605.
- Beel, Andrew J, Charles K Mobley, Hak Jun Kim, Fang Tian, Bing Jap Δ , James H Prestegard, and Charles R. Sanders. 2008. "NIH Public Access." *Biochemistry* 47 (36): 9428–46. doi:10.1021/bi800993c.Structural.

- Behr, D, L Hesse, C L Masters, and G Multhaup. 1996. "Regulation of Amyloid Protein Precursor (APP) Binding to Collagen and Mapping of the Binding Sites on APP and Collagen Type I." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (3): 1613–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576160>.
- Beisiegel, U, W Weber, G Ihrke, J Herz, and K K Stanley. 1989. "The LDL-Receptor-Related Protein, LRP, Is an Apolipoprotein E-Binding Protein." *Nature* 341 (6238): 162–64. doi:10.1038/341162a0.
- Belinson, Haim, Zehavit Kariv-Inbal, Rakez Kaye, Eliezer Masliah, and Daniel M Michaelson. 2010. "Following Activation of the Amyloid Cascade, Apolipoprotein E4 Drives the in Vivo Oligomerization of Amyloid- β Resulting in Neurodegeneration." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 22 (3): 959–70. doi:10.3233/JAD-2010-101008.
- Bell, Karen F S, Luyu Zheng, Falk Fahrenholz, and A Claudio Cuello. 2008. "ADAM-10 over-Expression Increases Cortical Synaptogenesis." *Neurobiology of Aging* 29 (4): 554–65. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.11.004.
- Belyaev, Nikolai D., Katherine A B Kellett, Caroline Beckett, Natalia Z. Makova, Timothy J. Revett, Natalia N. Nalivaeva, Nigel M. Hooper, and Anthony J. Turner. 2010. "The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a β -Secretase-Dependent Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 285 (53): 41443–54. doi:10.1074/jbc.M110.141390.
- Ben Khalifa, N., D. Tyteca, C. Marinangeli, M. Depuydt, J.-F. Collet, P. J. Courtoy, J.-C. Renault, S. Constantinescu, J.-N. Octave, and P. Kienlen-Campard. 2012. "Structural Features of the KPI Domain Control APP Dimerization, Trafficking, and Processing." *The FASEB Journal* 26 (2): 855–67. doi:10.1096/fj.11-190207.
- Benilova, Iryna, Rodrigo Gallardo, Andreea-Alexandra Ungureanu, Virginia Castillo Cano, An Snellinx, Meine Ramakers, Carmen Bartic, Frederic Rousseau, Joost Schymkowitz, and Bart De Strooper. 2014. "The Alzheimer Disease Protective Mutation A2T Modulates Kinetic and Thermodynamic Properties of Amyloid- β ($A\beta$) Aggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (45): 30977–89. doi:10.1074/jbc.M114.599027.
- Benjannet, Suzanne, Aram Elagöz, Louise Wickham, Maya Mamarbachi, Jon Scott Munzer, Ajoy Basak, Claude Lazure, et al. 2001. "Post-Translational Processing of β -Secretase (β -Amyloid-Converting Enzyme) and Its Ectodomain Shedding: The pro- and Transmembrane/cytosolic Domains Affect Its Cellular Activity and Amyloid- β Production." *Journal of Biological Chemistry* 276 (14): 10879–87. doi:10.1074/jbc.M009899200.
- Bergamaschini, Luigi, Cesare Donarini, Emanuela Rossi, Ada De Luigi, Carlo Vergani, and Maria Grazia De Simoni. 2002. "Heparin Attenuates Cytotoxic and Inflammatory Activity of Alzheimer Amyloid-Beta in Vitro." *Neurobiology of Aging* 23 (4): 531–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009502>.
- Bhattacharyya, Raja, Cory Barren, and Dora M Kovacs. 2013. "Palmitoylation of Amyloid Precursor Protein Regulates Amyloidogenic Processing in Lipid Rafts." *The Journal of Neuroscience* 33 (27): 11169–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.4704-12.2013.

- Biessels, G J, L J Kappelle, and Utrecht Diabetic Encephalopathy Study Group. 2005. "Increased Risk of Alzheimer's Disease in Type II Diabetes: Insulin Resistance of the Brain or Insulin-Induced Amyloid Pathology?" *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 5): 1041–44. doi:10.1042/BST20051041.
- Björkhem, Ingemar, Dieter Lütjohann, Ulf Diczfalusy, Lars Ståhle, Gunvor Ahlborg, and John Wahren. 1998. "Cholesterol Homeostasis in Human Brain : Turnover of 24S-Hydroxycholesterol and Evidence for a Cerebral Origin of Most of This Oxysterol in the Circulation" 39.
- Björkhem, Ingemar, Steve Meaney, and Alan M. Fogelman. 2004. "Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (5): 806–15. doi:10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b.
- Bodovitz, S, and W L Klein. 1996. "Cholesterol Modulates Alpha-Secretase Cleavage of Amyloid Precursor Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (8): 4436–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626795>.
- Boehm-Cagan, Anat, and Daniel M Michaelson. 2014. "Reversal of apoE4-Driven Brain Pathology and Behavioral Deficits by Bexarotene." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (21): 7293–7301. doi:10.1523/JNEUROSCI.5198-13.2014.
- Borchelt, D.R., T Ratovitski, J van Lare, M K Lee, V Gonzales, N A Jenkins, N G Copeland, D L Price, and S S Sisodia. 1997. "Accelerated Amyloid Deposition in the Brains of Transgenic Mice Coexpressing Mutant Presenilin-1 and Amyloid Precursor Protein." *Neuron* 19: 939–45.
- Borchelt, D.R., Gopal Thinakaran, Christopher B. Eckman, Michael K. Lee, Frances Davenport, Tamara Ratovitsky, Cristian-Mihail Prada, et al. 1996. "Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A β 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo." *Neuron* 17 (5): 1005–13. doi:10.1016/S0896-6273(00)80230-5.
- Bouwman, Femke H, Niki S M Schoonenboom, Nicolaas A Verwey, Evert J van Elk, Astrid Kok, Marinus A Blankenstein, Philip Scheltens, and Wiesje M van der Flier. 2009. "CSF Biomarker Levels in Early and Late Onset Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 30 (12): 1895–1901. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.02.007.
- Boyle, T P, and K R Marotti. 1992. "Structure of the Murine Gene Encoding Apolipoprotein A-I." *Gene* 117 (2): 243–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1639271>.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, E. Wilson, R. W. Mahley, and J. M. Taylor. 1985. "Apolipoprotein E Associated with Astrocytic Glia of the Central Nervous System and with Nonmyelinating Glia of the Peripheral Nervous System." *Journal of Clinical Investigation* 76 (4): 1501–13. doi:10.1172/JCI112130.
- Boyles, J K, L M Notterpek, M R Wardell, and S C Rall. 1990. "Identification, Characterization, and Tissue Distribution of Apolipoprotein D in the Rat." *Journal of Lipid Research* 31 (12): 2243–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2090718>.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>.
- Braak, Heiko, Irina Alafuzoff, Thomas Arzberger, Hans Kretschmar, and Kelly Del Tredici.

2006. "Staging of Alzheimer Disease-Associated Neurofibrillary Pathology Using Paraffin Sections and Immunocytochemistry." *Acta Neuropathologica* 112 (4): 389–404. doi:10.1007/s00401-006-0127-z.
- Brands, Augustina M A, Geert Jan Biessels, Edward H F de Haan, L Jaap Kappelle, and Roy P C Kessels. 2005. "The Effects of Type 1 Diabetes on Cognitive Performance: A Meta-Analysis." *Diabetes Care* 28 (3): 726–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735218>.
- Brandt, R, J Léger, and G Lee. 1995. "Interaction of Tau with the Neural Plasma Membrane Mediated by Tau's Amino-Terminal Projection Domain." *The Journal of Cell Biology* 131 (5): 1327–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8522593>.
- Brecht, Walter J, Faith M Harris, Shengjun Chang, Ina Tesseur, Gui-Qiu Yu, Qin Xu, Jo Dee Fish, et al. 2004. "Neuron-Specific Apolipoprotein e4 Proteolysis Is Associated with Increased Tau Phosphorylation in Brains of Transgenic Mice." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (10): 2527–34. doi:10.1523/JNEUROSCI.4315-03.2004.
- Breen, K C. 1992. "APP-Collagen Interaction Is Mediated by a Heparin Bridge Mechanism." *Molecular and Chemical Neuropathology* 16 (1–2): 109–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1520400>.
- Breteler, M M. 2000. "Vascular Involvement in Cognitive Decline and Dementia. Epidemiologic Evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study." *Annals of the New York Academy of Sciences* 903 (April): 457–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818538>.
- Bretillon, L, a Sidén, L O Wahlund, D Lütjohann, L Minthon, M Crisby, J Hillert, C G Groth, U Diczfalusy, and I Björkhem. 2000. "Plasma Levels of 24S-Hydroxycholesterol in Patients with Neurological Diseases." *Neuroscience Letters* 293: 87–90. doi:10.1016/s0304-3940(00)01466-x.
- Bretillon, Lionel, Ulf Diczfalusy, Ingemar Björkhem, Marie Annick Maire, Lucy Martine, Corinne Joffre, Niyazi Acar, Alain Bron, and Catherine Creuzot-Garcher. 2007. "Cholesterol-24S-Hydroxylase (CYP46A1) Is Specifically Expressed in Neurons of the Neural Retina." *Current Eye Research* 32 (4): 361–66. doi:10.1080/02713680701231857.
- Brion, J P, A M Couck, E Passareiro, and J Flament-Durand. 1985. "Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease: An Immunohistochemical Study." *Journal of Submicroscopic Cytology* 17 (1): 89–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3973960>.
- Brown, D A, and E London. 1998. "Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14: 111–36. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.111.
- Brown, Michael S, and Joseph L Goldstein. 2009. "Cholesterol Feedback: From Schoenheimer's Bottle to Scap's MELADL." *Journal of Lipid Research* 50 Suppl (50): S15–27. doi:10.1194/jlr.R800054-JLR200.
- Buée, L, T Bussière, V Buée-Scherrer, A Delacourte, and P R Hof. 2000. "Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders." *Brain Research*.

Brain Research Reviews 33 (1): 95–130.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967355>.

- Bugiani, Orso, Giorgio Giaccone, Giacomina Rossi, Michela Mangieri, Raffaella Capobianco, Michela Morbin, Giulia Mazzoleni, et al. 2010. “Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis Associated with the E693K Mutation of APP.” *Archives of Neurology* 67 (8): 987–95. doi:10.1001/archneurol.2010.178.
- Burgess, Braydon L, Pamela F Parkinson, Margaret M Racke, Veronica Hirsch-Reinshagen, Jianjia Fan, Charmaine Wong, Sophie Stukas, et al. 2008. “ABCG1 Influences the Brain Cholesterol Biosynthetic Pathway but Does Not Affect Amyloid Precursor Protein or Apolipoprotein E Metabolism in Vivo.” *Journal of Lipid Research* 49 (6): 1254–67. doi:10.1194/jlr.M700481-JLR200.
- Burlot, Marie Anne, J??r??me Braudeau, Kristin Michaelsen-Preusse, Brigitte Potier, Sophie Ayciriex, Jennifer Varin, Benoit Gautier, et al. 2015. “Cholesterol 24-Hydroxylase Defect Is Implicated in Memory Impairments Associated with Alzheimer-like Tau Pathology.” *Human Molecular Genetics* 24 (21): 5965–76. doi:10.1093/hmg/ddv268.
- Bush, A I, W H Pettingell, M de Paradis, R E Tanzi, and W Wasco. 1994. “The Amyloid Beta-Protein Precursor and Its Mammalian Homologues. Evidence for a Zinc-Modulated Heparin-Binding Superfamily.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (43): 26618–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929392>.
- Buttini, Manuel, Eliezer Masliah, Gui-Qiu Yu, Jorge J Palop, Shengjun Chang, Aubrey Bernardo, Carol Lin, Tony Wyss-Coray, Yadong Huang, and Lennart Mucke. 2010. “Cellular Source of Apolipoprotein E4 Determines Neuronal Susceptibility to Excitotoxic Injury in Transgenic Mice.” *The American Journal of Pathology* 177 (2): 563–69. doi:10.2353/ajpath.2010.090973.
- Buxbaum, J D, K N Liu, Y Luo, J L Slack, K L Stocking, J J Peschon, R S Johnson, B J Castner, D P Cerretti, and R A Black. 1998. “Evidence That Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme Is Involved in Regulated Alpha-Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 27765–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774383>.
- Cacace, Rita, Kristel Slegers, and Christine Van Broeckhoven. 2016. “Molecular Genetics of Early-Onset Alzheimer’s Disease Revisited.” *Alzheimer’s and Dementia* 12 (6). Elsevier Inc.: 733–48. doi:10.1016/j.jalz.2016.01.012.
- Caccamo, Antonella, Salvatore Oddo, Michael C Sugarman, Yama Akbari, and Frank M LaFerla. 2005. “Age- and Region-Dependent Alterations in Abeta-Degrading Enzymes: Implications for Abeta-Induced Disorders.” *Neurobiology of Aging* 26 (5): 645–54. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.013.
- Canevari, Laura, and John B Clark. 2007. “Alzheimer’s Disease and Cholesterol: The Fat Connection.” *Neurochemical Research* 32 (4–5): 739–50. doi:10.1007/s11064-006-9200-1.
- Cao, X, and T C Südhof. 2001. “A Transcriptionally [Correction of Transcriptively] Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60.” *Science (New York, N.Y.)* 293 (5527): 115–20. doi:10.1126/science.1058783.

- Castano, E M, F Prelli, T Wisniewski, a Golabek, R a Kumar, C Soto, and B Frangione. 1995. "Fibrillogenesis in Alzheimer's Disease of Amyloid Beta Peptides and Apolipoprotein E." *The Biochemical Journal* 306 (Pt 2) (1995): 599–604. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534068><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1136559>.
- Castellano, Joseph M, Jungsu Kim, Floy R Stewart, Hong Jiang, Ronald B Demattos, Bruce W Patterson, Anne M Fagan, et al. 2012. "NIH Public Access" 3 (89). doi:10.1126/scitranslmed.3002156.Human.
- Castellano, Joseph M, Jungsu Kim, Floy R Stewart, Hong Jiang, Ronald B DeMattos, Bruce W Patterson, Anne M Fagan, et al. 2011. "Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance." *Science Translational Medicine* 3 (89): 89ra57. doi:10.1126/scitranslmed.3002156.
- Chang, Ta-Yuan, Bo-Liang Li, Catherine C Y Chang, and Yasuomi Urano. 2009. "Acyl-Coenzyme A:cholesterol Acyltransferases." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297 (1): E1-9. doi:10.1152/ajpendo.90926.2008.
- Chêne, Geneviève, Alexa Beiser, Rhoda Au, Sarah R Preis, Philip A Wolf, Carole Dufouil, and Sudha Seshadri. 2015. "Gender and Incidence of Dementia in the Framingham Heart Study from Mid-Adult Life." *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 11 (3): 310–20. doi:10.1016/j.jalz.2013.10.005.
- Chételat, G, B Desgranges, B Landeau, F Mézenge, J B Poline, V de la Sayette, F Viader, F Eustache, and J-C Baron. 2008. "Direct Voxel-Based Comparison between Grey Matter Hypometabolism and Atrophy in Alzheimer's Disease." *Brain : A Journal of Neurology* 131 (Pt 1): 60–71. doi:10.1093/brain/awm288.
- Choi, Seok Rye, Geoff Golding, Zhiping Zhuang, Wei Zhang, Nathaniel Lim, Franz Hefti, Tyler E Benedum, Michael R Kilbourn, Daniel Skovronsky, and Hank F Kung. 2009. "Preclinical Properties of 18F-AV-45: A PET Agent for Abeta Plaques in the Brain." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 50 (11): 1887–94. doi:10.2967/jnumed.109.065284.
- Choo-Smith, L P, W Garzon-Rodriguez, C G Glabe, and W K Surewicz. 1997. "Acceleration of Amyloid Fibril Formation by Specific Binding of Abeta-(1-40) Peptide to Ganglioside-Containing Membrane Vesicles." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (37): 22987–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287293>.
- Citron, M, T Oltersdorf, C Haass, L McConlogue, A Y Hung, P Seubert, C Vigo-Pelfrey, I Lieberburg, and D J Selkoe. 1992. "Mutation of the Beta-Amyloid Precursor Protein in Familial Alzheimer's Disease Increases Beta-Protein Production." *Nature* 360 (6405): 672–74. doi:10.1038/360672a0.
- Citron, M, C Vigo-Pelfrey, D B Teplow, C Miller, D Schenk, J Johnston, B Winblad, N Venizelos, L Lannfelt, and D J Selkoe. 1994. "Excessive Production of Amyloid Beta-Protein by Peripheral Cells of Symptomatic and Presymptomatic Patients Carrying the Swedish Familial Alzheimer Disease Mutation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (25): 11993–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7991571>.
- Citron, M, D Westaway, W Xia, G Carlson, T Diehl, G Levesque, K Johnson-Wood, et al.

1997. "Mutant Presenilins of Alzheimer's Disease Increase Production of 42-Residue Amyloid Beta-Protein in Both Transfected Cells and Transgenic Mice." *Nature Medicine* 3 (1): 67–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986743>.
- Clark, Christopher M, Julie A Schneider, Barry J Bedell, Thomas G Beach, Warren B Bilker, Mark A Mintun, Michael J Pontecorvo, et al. 2011. "Use of Florbetapir-PET for Imaging Beta-Amyloid Pathology." *JAMA* 305 (3): 275–83. doi:10.1001/jama.2010.2008.
- Colin, Julie, Ahmad Allouche, Fabien Chauveau, Catherine Corbier, Lynn Pauron-Gregory, Marie-Claire Lanhers, Thomas Claudepierre, Frances T Yen, Thierry Oster, and Catherine Malaplate-Armand. 2016. "Improved Neuroprotection Provided by Drug Combination in Neurons Exposed to Cell-Derived Soluble Amyloid- β Peptide." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 52 (3): 975–87. doi:10.3233/JAD-151110.
- Colin, Julie, Lynn Gregory-Pauron, Marie-Claire Lanhers, Thomas Claudepierre, Catherine Corbier, Frances T. Yen, Catherine Malaplate-Armand, and Thierry Oster. 2016. "Membrane Raft Domains and Remodeling in Aging Brain." *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2016.08.014.
- Cooper, Matthew A. 2002. "Optical Biosensors in Drug Discovery." *Nature Reviews. Drug Discovery* 1 (7): 515–28. doi:10.1038/nrd838.
- Copanaki, Ekaterini, Steffi Chang, Andreas Vlachos, Jakob-A Tschäpe, Ulrike C Müller, Donat Kögel, and Thomas Deller. 2010. "sAPP α Antagonizes Dendritic Degeneration and Neuron Death Triggered by Proteasomal Stress." *Molecular and Cellular Neurosciences* 44 (4): 386–93. doi:10.1016/j.mcn.2010.04.007.
- Corder, E H, A M Saunders, N J Risch, W J Strittmatter, D E Schmechel, P C Gaskell, J B Rimmler, P A Locke, P M Conneally, and K E Schmechel. 1994. "Protective Effect of Apolipoprotein E Type 2 Allele for Late Onset Alzheimer Disease." *Nature Genetics* 7 (2): 180–84. doi:10.1038/ng0694-180.
- Corder, E H, A M Saunders, W J Strittmatter, D E Schmechel, P C Gaskell, G W Small, A D Roses, J L Haines, and M A Pericak-Vance. 1993. "Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families." *Science (New York, N.Y.)* 261 (5123): 921–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346443>.
- Corrigan, Frances, Robert Vink, Peter C. Blumbergs, Colin L. Masters, Roberto Cappai, and Corinna Van Den Heuvel. 2012. "SAPP β Rescues Deficits in Amyloid Precursor Protein Knockout Mice Following Focal Traumatic Brain Injury." *Journal of Neurochemistry* 122 (1): 208–20. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07761.x.
- Cossec, Jack-Christophe, Jérémie Lavaur, Diego E Berman, Isabelle Rivals, Alexander Hoischen, Samantha Stora, Clémentine Ripoll, et al. 2012. "Trisomy for synaptojanin1 in Down Syndrome Is Functionally Linked to the Enlargement of Early Endosomes." *Human Molecular Genetics* 21 (14): 3156–72. doi:10.1093/hmg/dds142.
- Cossec, Jack Christophe, Anne Simon, Catherine Marquer, Randal X. Moldrich, Christophe Leterrier, Jean Rossier, Charles Duyckaerts, Zsolt Lenkei, and Marie Claude Potier. 2010. "Clathrin-Dependent APP Endocytosis and A β Secretion Are Highly Sensitive to the Level of Plasma Membrane Cholesterol." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801 (8). Elsevier B.V.: 846–52. doi:10.1016/j.bbaliip.2010.05.010.

- Craft, Suzanne, S Asthana, J W Newcomer, C W Wilkinson, I T Matos, L D Baker, M Cherrier, et al. 1999. "Enhancement of Memory in Alzheimer Disease with Insulin and Somatostatin, but Not Glucose." *Archives of General Psychiatry* 56 (12): 1135–40. doi:10.1001/archpsyc.56.12.1135.
- Craft, Suzanne, Sanjay Asthana, David G Cook, Laura D Baker, Monique Cherrier, Kristina Purganan, Colby Wait, et al. 2003. "Insulin Dose-Response Effects on Memory and Plasma Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease: Interactions with Apolipoprotein E Genotype." *Psychoneuroendocrinology* 28 (6): 809–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12812866>.
- Cramer, Paige E, John R Cirrito, Daniel W Wesson, C Y Daniel Lee, J Colleen Karlo, Adriana E Zinn, Brad T Casali, et al. 2012. "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models." *Science (New York, N.Y.)* 335 (6075): 1503–6. doi:10.1126/science.1217697.
- Crocker, Paul R, James C Paulson, and Ajit Varki. 2007. "Siglecs and Their Roles in the Immune System." *Nature Reviews. Immunology* 7 (4): 255–66. doi:10.1038/nri2056.
- Cukierman, T., H. C. Gerstein, and J. D. Williamson. 2005. "Cognitive Decline and Dementia in Diabetes - Systematic Overview of Prospective Observational Studies." *Diabetologia* 48 (12): 2460–69. doi:10.1007/s00125-005-0023-4.
- Cutler, RG, and J Kelly. 2004. "Involvement of Oxidative Stress-Induced Abnormalities in Ceramide and Cholesterol Metabolism in Brain Aging and Alzheimer's Disease." *Proceedings of the ...*, no. Track II: 1–6. <http://www.pnas.org/content/101/7/2070.short>.
- Cyster, Jason G, Eric V Dang, Andrea Reboldi, and Tangsheng Yi. 2014. "25-Hydroxycholesterols in Innate and Adaptive Immunity." *Nature Reviews. Immunology* 14 (11): 731–43. doi:10.1038/nri3755.
- Dahms, Sven O, Sandra Hoefgen, Dirk Roeser, Bernhard Schlott, Karl-Heinz Gührs, and Manuel E Than. 2010. "Structure and Biochemical Analysis of the Heparin-Induced E1 Dimer of the Amyloid Precursor Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (12): 5381–86. doi:10.1073/pnas.0911326107.
- David W. Russell, Rebekkah W. Halford, Denise M.O. Ramirez, Rahul Shah. 2008. "NIH Public Access." *Annu Rev Bio* 100 (2): 130–34. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations.
- Dawson, H N, A Ferreira, M V Eyster, N Ghoshal, L I Binder, and M P Vitek. 2001. "Inhibition of Neuronal Maturation in Primary Hippocampal Neurons from Tau Deficient Mice." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 6): 1179–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11228161>.
- De Jonghe, C, C Esselens, S Kumar-Singh, K Craessaerts, S Serneels, F Checler, W Annaert, C Van Broeckhoven, and B De Strooper. 2001. "Pathogenic APP Mutations near the Gamma-Secretase Cleavage Site Differentially Affect Abeta Secretion and APP C-Terminal Fragment Stability." *Human Molecular Genetics* 10 (16): 1665–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487570>.
- De Jonghe, C, C Zehr, D Yager, C M Prada, S Younkin, L Hendriks, C Van Broeckhoven,

- and C B Eckman. 1998. "Flemish and Dutch Mutations in Amyloid Beta Precursor Protein Have Different Effects on Amyloid Beta Secretion." *Neurobiology of Disease* 5 (4): 281–86. doi:10.1006/nbdi.1998.0202.
- de la Monte, S M, and J R Wands. 2005. "Review of Insulin and Insulin-like Growth Factor Expression, Signaling, and Malfunction in the Central Nervous System: Relevance to Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 7 (1): 45–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750214>.
- Deane, Rashid, Abhay Sagare, Katie Hamm, Margaret Parisi, Steven Lane, Mary Beth Finn, David M Holtzman, and Berislav V Zlokovic. 2008. "apoE Isoform-Specific Disruption of Amyloid Beta Peptide Clearance from Mouse Brain." *The Journal of Clinical Investigation* 118 (12): 4002–13. doi:10.1172/JCI36663.
- Deane, Rashid, Zhenhua Wu, and Berislav V Zlokovic. 2004. "RAGE (Yin) versus LRP (Yang) Balance Regulates Alzheimer Amyloid Beta-Peptide Clearance through Transport across the Blood-Brain Barrier." *Stroke* 35 (11 Suppl 1): 2628–31. doi:10.1161/01.STR.0000143452.85382.d1.
- De Strooper, Bart, Robert Vassar, and Todd Golde. 2010. "The Secretases: Enzymes with Therapeutic Potential in Alzheimer Disease." *Nature Reviews. Neurology* 6 (2). Nature Publishing Group: 99–107. doi:10.1038/nrneurol.2009.218.
- De Strooper, B, P Saftig, K Craessaerts, H Vanderstichele, G Guhde, W Annaert, K Von Figura, and F Van Leuven. 1998. "Deficiency of Presenilin-1 Inhibits the Normal Cleavage of Amyloid Precursor Protein." *Nature* 391 (6665): 387–90. doi:10.1038/34910.
- Decock, Marie, Laetitia El Haylani, Serena Stanga, Ilse Dewachter, Jean Noël Octave, Steven O. Smith, Stefan N. Constantinescu, and Pascal Kienlen-Campard. 2015. "Analysis by a Highly Sensitive Split Luciferase Assay of the Regions Involved in APP Dimerization and Its Impact on Processing." *FEBS Open Bio* 5: 763–73. doi:10.1016/j.fob.2015.09.002.
- Decock, Marie, Serena Stanga, Jean Noël Octave, Ilse Dewachter, Steven O. Smith, Stefan N. Constantinescu, and Pascal Kienlen-Campard. 2016. "Glycines from the APP GXXXG/GXXXA Transmembrane Motifs Promote Formation of Pathogenic A β Oligomers in Cells." *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (MAY): 1–15. doi:10.3389/fnagi.2016.00107.
- Delaère, P, C Duyckaerts, C Masters, K Beyreuther, F Piette, and J J Hauw. 1990. "Large Amounts of Neocortical Beta A4 Deposits without Neuritic Plaques nor Tangles in a Psychometrically Assessed, Non-Demented Person." *Neuroscience Letters* 116 (1–2): 87–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2259457>.
- DeMattos, R B, R P Brendza, J E Heuser, M Kierson, J R Cirrito, J Fryer, P M Sullivan, A M Fagan, X Han, and D M Holtzman. 2001. "Purification and Characterization of Astrocyte-Secreted Apolipoprotein E and J-Containing Lipoproteins from Wild-Type and Human apoE Transgenic Mice." *Neurochemistry International* 39 (5–6): 415–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578777>.
- DeMattos, Ronald B., John R. Cirrito, Maia Parsadanian, Patrick C. May, Mark A. O'Dell, Jennie W. Taylor, Judith A K Harmony, et al. 2004. "ApoE and Clusterin Cooperatively

- Suppress A β Levels and Deposition: Evidence That ApoE Regulates Extracellular A β Metabolism In Vivo.” *Neuron* 41 (2): 193–202. doi:10.1016/S0896-6273(03)00850-X.
- Desikan, Rahul S, Howard J Cabral, Christopher P Hess, William P Dillon, Christine M Glastonbury, Michael W Weiner, Nicholas J Schmansky, et al. 2009. “Automated MRI Measures Identify Individuals with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease.” *Brain : A Journal of Neurology* 132 (Pt 8): 2048–57. doi:10.1093/brain/awp123.
- Di Fede, Giuseppe, Marcella Catania, Michela Morbin, Giacomina Rossi, Silvia Suardi, Giulia Mazzoleni, Marco Merlin, et al. 2009. “A Recessive Mutation in the APP Gene with Dominant-Negative Effect on Amyloidogenesis.” *Science (New York, N.Y.)* 323 (5920): 1473–77. doi:10.1126/science.1168979.
- Di Paolo, Gilbert, and Tae-Wan Kim. 2011. “Linking Lipids to Alzheimer’s Disease: Cholesterol and Beyond.” *Nature Reviews. Neuroscience* 12 (5): 284–96. doi:10.1038/nrn3012.
- Di Scala, Coralie, Nouara Yahi, Clément Lelièvre, Nicolas Garmy, Henri Chahinian, and Jacques Fantini. 2013. “Biochemical Identification of a Linear Cholesterol-Binding Domain within Alzheimer’s β Amyloid Peptide.” *ACS Chemical Neuroscience* 4 (3): 509–17. doi:10.1021/cn300203a.
- Dickerson, Bradford C, David A Wolk, and Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. 2012. “MRI Cortical Thickness Biomarker Predicts AD-like CSF and Cognitive Decline in Normal Adults.” *Neurology* 78 (2): 84–90. doi:10.1212/WNL.0b013e31823efc6c.
- Dietschy, J.M., and S D Turley. 2001. “Cholesterol Metabolism in the Brain.” *Current Opinion in Lipidology* 12 (2): 105–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264981>.
- Dietschy, John M, and Stephen D Turley. 2004. “Thematic Review Series: Brain Lipids. Cholesterol Metabolism in the Central Nervous System during Early Development and in the Mature Animal.” *Journal of Lipid Research* 45 (8): 1375–97. doi:10.1194/jlr.R400004-JLR200.
- Djelti, Fathia, Jerome Braudeau, Eloise Hudry, Marc Dhenain, Jennifer Varin, Ivan Bièche, Catherine Marquer, et al. 2015. “CYP46A1 Inhibition, Brain Cholesterol Accumulation and Neurodegeneration Pave the Way for Alzheimer’s Disease.” *Brain* 138 (8): 2383–98. doi:10.1093/brain/awv166.
- Dong, L M, C Wilson, M R Wardell, T Simmons, R W Mahley, K H Weisgraber, and D A Agard. 1994. “Human Apolipoprotein E. Role of Arginine 61 in Mediating the Lipoprotein Preferences of the E3 and E4 Isoforms.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (35): 22358–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8071364>.
- Donkin, James J, Sophie Stukas, Veronica Hirsch-Reinshagen, Dhananjay Namjoshi, Anna Wilkinson, Sharon May, Jeniffer Chan, Jianjia Fan, Jon Collins, and Cheryl L Wellington. 2010. “ATP-Binding Cassette Transporter A1 Mediates the Beneficial Effects of the Liver X Receptor Agonist GW3965 on Object Recognition Memory and Amyloid Burden in Amyloid Precursor Protein/presenilin 1 Mice.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (44): 34144–54. doi:10.1074/jbc.M110.108100.
- Doraiswamy, P. Murali, Reisa A. Sperling, R. Edward Coleman, Keith A. Johnson, Eric M.

- Reiman, Mat D. Davis, Michael Grundman, et al. 2012. "Amyloid-?? Assessed by Florbetapir F 18 PET and 18-Month Cognitive Decline: A Multicenter Study." *Neurology* 79 (16): 1636–44. doi:10.1212/WNL.0b013e3182661f74.
- Drubin, D G, and M W Kirschner. 1986. "Tau Protein Function in Living Cells." *The Journal of Cell Biology* 103 (6 Pt 2): 2739–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3098742>.
- Drzezga, Alexander. 2010. "Amyloid-Plaque Imaging in Early and Differential Diagnosis of Dementia." *Annals of Nuclear Medicine* 24 (2): 55–66. doi:10.1007/s12149-009-0330-9.
- Du, A T, N Schuff, J H Kramer, S Ganzer, X P Zhu, W J Jagust, B L Miller, et al. 2004. "Higher Atrophy Rate of Entorhinal Cortex than Hippocampus in AD." *Neurology* 62 (3): 422–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14872024>.
- Dubal, Dena B, and Phyllis M Wise. 2002. "Estrogen and Neuroprotection: From Clinical Observations to Molecular Mechanisms." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 4 (2): 149–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034440>.
- Dubois, Bruno, Howard H. Feldman, Claudia Jacova, Steven T. DeKosky, Pascale Barberger-Gateau, Jeffrey Cummings, Andr?? Delacourte, et al. 2007. "Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: Revising the NINCDS-ADRDA Criteria." *Lancet Neurology* 6 (8): 734–46. doi:10.1016/S1474-4422(07)70178-3.
- Duff, K, C Eckman, C Zehr, X Yu, C M Prada, J Perez-tur, M Hutton, et al. 1996. "Increased Amyloid-beta42(43) in Brains of Mice Expressing Mutant Presenilin 1." *Nature* 383 (6602): 710–13. doi:10.1038/383710a0.
- Dulin, Fabienne, Frédéric Léveillé, Javier Becerril Ortega, Jean Paul Mornon, Alain Buisson, Isabelle Callebaut, and Nathalie Colloc'h. 2008. "p3 Peptide, a Truncated Form of A β Devoid of Synaptotoxic Effect, Does Not Assemble into Soluble Oligomers." *FEBS Letters* 582 (13): 1865–70. doi:10.1016/j.febslet.2008.05.002.
- Duval, Aurélien, Aude Laisné, Denis Pompon, Sylvain Held, Alain Bellemain, Julien Moreau, and Michael Canva. 2009. "Polarimetric Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensor." *Optics Letters* 34 (23): 3634–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19953144>.
- Duyckaerts, Charles, Benoît Delatour, and Marie Claude Potier. 2009. "Classification and Basic Pathology of Alzheimer Disease." *Acta Neuropathologica* 118 (1): 5–36. doi:10.1007/s00401-009-0532-1.
- Eckman, C B, N D Mehta, R Crook, J Perez-tur, G Prihar, E Pfeiffer, N Graff-Radford, et al. 1997. "A New Pathogenic Mutation in the APP Gene (I716V) Increases the Relative Proportion of A Beta 42(43)." *Human Molecular Genetics* 6 (12): 2087–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328472>.
- Edbauer, Dieter, Michael Willem, Sven Lammich, Harald Steiner, and Christian Haass. 2002. "Insulin-Degrading Enzyme Rapidly Removes the ??-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD)." *Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 13389–93. doi:10.1074/jbc.M111571200.
- Edbauer, Dieter, Edith Winkler, Joerg T Regula, Brigitte Pesold, Harald Steiner, and Christian Haass. 2003. "Reconstitution of Gamma-Secretase Activity." *Nature Cell Biology* 5 (5): 486–88. doi:10.1038/ncb960.

- Ehehalt, Robert, Patrick Keller, Christian Haass, Christoph Thiele, and Kai Simons. 2003. "Amyloidogenic Processing of the Alzheimer ??-Amyloid Precursor Protein Depends on Lipid Rafts." *Journal of Cell Biology* 160 (1): 113–23. doi:10.1083/jcb.200207113.
- Elshourbagy, N A, W S Liao, R W Mahley, and J M Taylor. 1985. "Apolipoprotein E mRNA Is Abundant in the Brain and Adrenals, as Well as in the Liver, and Is Present in Other Peripheral Tissues of Rats and Marmosets." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (1): 203–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3918303>.
- Epand, Raquel F, Annick Thomas, Robert Brasseur, Sundaram A Vishwanathan, Eric Hunter, and Richard M Epand. 2006. "Juxtamembrane Protein Segments That Contribute to Recruitment of Cholesterol into Domains." *Biochemistry* 45 (19): 6105–14. doi:10.1021/bi060245+.
- Epand, Richard M. 2006. "Cholesterol and the Interaction of Proteins with Membrane Domains." *Progress in Lipid Research* 45 (4): 279–94. doi:10.1016/j.plipres.2006.02.001.
- Erickson, Michelle A, and William A Banks. 2013. "Blood-Brain Barrier Dysfunction as a Cause and Consequence of Alzheimer's Disease." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (10): 1500–1513. doi:10.1038/jcbfm.2013.135.
- Esiri, M M. 2007. "Ageing and the Brain." *The Journal of Pathology* 211 (2): 181–87. doi:10.1002/path.2089.
- Evans, K C, E P Berger, C G Cho, K H Weisgraber, and P T Lansbury. 1995. "Apolipoprotein E Is a Kinetic but Not a Thermodynamic Inhibitor of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Alzheimer Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (3): 763–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7846048>.
- Fagan, A.M, Denise Head, Aarti R Shah, Daniel Marcus, Mark Mintun, John C Morris, and David M Holtzman. 2009. "Decreased Cerebrospinal Fluid A β (42) Correlates with Brain Atrophy in Cognitively Normal Elderly." *Annals of Neurology* 65 (2): 176–83. doi:10.1002/ana.21559.
- Fagan, A M, D M Holtzman, G Munson, T Mathur, D Schneider, L K Chang, G S Getz, et al. 1999. "Unique Lipoproteins Secreted by Primary Astrocytes from Wild Type, apoE (-/-), and Human apoE Transgenic Mice." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 30001–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514484>.
- Fagan, Anne M., Mark A. Mintun, Robert H. Mach, Sang Yoon Lee, Carmen S. Dence, Aarti R. Shah, Gina N. LaRossa, et al. 2006. "Inverse Relation between in Vivo Amyloid Imaging Load and Cerebrospinal Fluid A β (42) in Humans." *Annals of Neurology* 59 (3): 512–19. doi:10.1002/ana.20730.
- Fagan, Anne M, Catherine M Roe, Chengjie Xiong, Mark A Mintun, John C Morris, and David M Holtzman. 2007. "Cerebrospinal Fluid Tau/ β -amyloid(42) Ratio as a Prediction of Cognitive Decline in Nondemented Older Adults." *Archives of Neurology* 64 (3): 343–49. doi:10.1001/archneur.64.3.noc60123.

- Fantini, Jacques, and Francisco J Barrantes. 2009. "Sphingolipid/cholesterol Regulation of Neurotransmitter Receptor Conformation and Function." *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (11): 2345–61. doi:10.1016/j.bbamem.2009.08.016.
- Farrer, LA Lindsay A., Adrienne L. Cupples, Jonathan L. JL Haines, Bradley Hyman, Walter A. Kukuli, Richard Mayeux, Richard H. Myers, et al. 1997. "Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease." ... *Medical Association* 2118. doi:10.1001/jama.1997.03550160069041.
- Farris, Wesley, Stefan Mansourian, Yang Chang, Loren Lindsley, Elizabeth A Eckman, Matthew P Frosch, Christopher B Eckman, Rudolph E Tanzi, Dennis J Selkoe, and Suzanne Guenette. 2003. "Insulin-Degrading Enzyme Regulates the Levels of Insulin, Amyloid Beta-Protein, and the Beta-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4162–67. doi:10.1073/pnas.0230450100.
- Farris, Wesley, Sonja G Schütz, John R Cirrito, Ganesh M Shankar, Xiaoyan Sun, Ana George, Malcolm A Leissring, et al. 2007. "Loss of Neprilysin Function Promotes Amyloid Plaque Formation and Causes Cerebral Amyloid Angiopathy." *The American Journal of Pathology* 171 (1): 241–51. doi:10.2353/ajpath.2007.070105.
- Fassbender, K, M Simons, C Bergmann, M Stroick, D Lutjohann, P Keller, H Runz, et al. 2001. "Simvastatin Strongly Reduces Levels of Alzheimer's Disease Beta -Amyloid Peptides Abeta 42 and Abeta 40 in Vitro and in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (10): 5856–61. doi:10.1073/pnas.081620098.
- Fillit, Howard M. 2002. "The Role of Hormone Replacement Therapy in the Prevention of Alzheimer Disease." *Archives of Internal Medicine* 162 (17): 1934–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230415>.
- Fitz, Nicholas F, Andrea A Cronican, Iliya Lefterov, and Radosveta Koldamova. 2013. "Comment on 'ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models'." *Science (New York, N.Y.)* 340 (6135): 924–c. doi:10.1126/science.1235809.
- Fitz, Nicholas F, Andrea Cronican, Tam Pham, Allison Fogg, Abdul H Fauq, Robert Chapman, Iliya Lefterov, and Radosveta Koldamova. 2010. "Liver X Receptor Agonist Treatment Ameliorates Amyloid Pathology and Memory Deficits Caused by High-Fat Diet in APP23 Mice." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (20): 6862–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.1051-10.2010.
- Fleisher, Adam S, Kewei Chen, Xiaofen Liu, Auttawut Roontiva, Pradeep Thiyyagura, Napatkamon Ayutyanont, Abhinay D Joshi, et al. 2011. "Using Positron Emission Tomography and Florbetapir F18 to Image Cortical Amyloid in Patients with Mild Cognitive Impairment or Dementia due to Alzheimer Disease." *Archives of Neurology* 68 (11): 1404–11. doi:10.1001/archneurol.2011.150.
- Florent-Béchar, Sabrina, Catherine Malaplate-Armand, Violette Koziel, Badreddine Kriem, Jean-Luc Olivier, Thierry Pillot, and Thierry Oster. 2007. "Towards a Nutritional Approach for Prevention of Alzheimer's Disease: Biochemical and Cellular Aspects." *Journal of the Neurological Sciences* 262 (1–2): 27–36. doi:10.1016/j.jns.2007.06.046.

- Fol, Romain, Jerome Braudeau, Susann Ludewig, Tobias Abel, Sascha W. Weyer, Jan Peter Roederer, Florian Brod, et al. 2016. "Viral Gene Transfer of APP^s Rescues Synaptic Failure in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Acta Neuropathologica* 131 (2). Springer Berlin Heidelberg: 247–66. doi:10.1007/s00401-015-1498-9.
- Fraering, Patrick C, Matthew J LaVoie, Wenjuan Ye, Beth L Ostaszewski, W Taylor Kimberly, Dennis J Selkoe, and Michael S Wolfe. 2004. "Detergent-Dependent Dissociation of Active Gamma-Secretase Reveals an Interaction between Pen-2 and PS1-NTF and Offers a Model for Subunit Organization within the Complex." *Biochemistry* 43 (2): 323–33. doi:10.1021/bi035748j.
- Fraering, Patrick C, Wenjuan Ye, Jean-Marc Strub, Georgia Dolios, Matthew J LaVoie, Beth L Ostaszewski, Alain van Dorsselaer, Rong Wang, Dennis J Selkoe, and Michael S Wolfe. 2004. "Purification and Characterization of the Human Gamma-Secretase Complex." *Biochemistry* 43 (30): 9774–89. doi:10.1021/bi0494976.
- Fu, Yuan, Jing Zhao, Yuka Atagi, Henrietta M Nielsen, Chia-Chen Liu, Honghua Zheng, Mitsuru Shinohara, Takahisa Kanekiyo, and Guojun Bu. 2016. "Apolipoprotein E Lipoprotein Particles Inhibit Amyloid- β Uptake through Cell Surface Heparan Sulphate Proteoglycan." *Molecular Neurodegeneration* 11 (1): 37. doi:10.1186/s13024-016-0099-y.
- Furukawa, K, B L Sopher, R E Rydel, J G Begley, D G Pham, G M Martin, M Fox, and M P Mattson. 1996. "Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of Alpha-Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain." *Journal of Neurochemistry* 67 (5): 1882–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8863493>.
- Futamura, Miho, Padmaja Dhanasekaran, Tetsuro Handa, Michael C Phillips, Sissel Lund-Katz, and Hiroyuki Saito. 2005. "Two-Step Mechanism of Binding of Apolipoprotein E to Heparin: Implications for the Kinetics of Apolipoprotein E-Heparan Sulfate Proteoglycan Complex Formation on Cell Surfaces." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (7): 5414–22. doi:10.1074/jbc.M411719200.
- Garai, Kanchan, Philip B Verghese, Berevan Baban, David M Holtzman, and Carl Frieden. 2014. "The Binding of Apolipoprotein E to Oligomers and Fibrils of Amyloid- β Alters the Kinetics of Amyloid Aggregation." *Biochemistry* 53 (40): 6323–31. doi:10.1021/bi5008172.
- Gendreau, Kerry L, and Garth F Hall. 2013. "Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem." *Frontiers in Neurology* 4 (October): 160. doi:10.3389/fneur.2013.00160.
- Ghosal, Kaushik, Daniel L. Vogt, Man Liang, Yong Shen, Bruce T. Lamb, and Sanjay W. Pimplikar. 2009. "Alzheimer's Disease-like Pathological Features in Transgenic Mice Expressing the APP Intracellular Domain." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (43): 18367–72. doi:10.1073/pnas.0907652106.
- Giaccone, Giorgio, Michela Morbin, Fabio Moda, Mario Botta, Giulia Mazzoleni, Andrea Uggetti, Marcella Catania, et al. 2010. "Neuropathology of the Recessive A673V APP Mutation: Alzheimer Disease with Distinctive Features." *Acta Neuropathologica* 120 (6): 803–12. doi:10.1007/s00401-010-0747-1.

- Giannakopoulos, P, F R Herrmann, T Bussi re, C Bouras, E K vari, D P Perl, J H Morrison, G Gold, and P R Hof. 2003. "Tangle and Neuron Numbers, but Not Amyloid Load, Predict Cognitive Status in Alzheimer's Disease." *Neurology* 60 (9): 1495–1500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743238>.
- Giau, Vo Van, Eva Bagyinszky, Seong Soo A An, and SangYun Kim. 2015. "Role of Apolipoprotein E in Neurodegenerative Diseases." *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11: 1723–37. doi:10.2147/NDT.S84266.
- Girardot, Nad ge, Bernadette Allinquant, and Charles Duyckaerts. 2003. "[Lipid Rafts, Flotillin-1 and Alzheimer Disease]." *Journal de La Societe de Biologie* 197 (3): 223–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708344>.
- Glenner, G G, and C W Wong. 1984. "Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120 (3): 885–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6375662>.
- Goate, A, M C Chartier-Harlin, M Mullan, J Brown, F Crawford, L Fidani, L Giuffra, A Haynes, N Irving, and L James. 1991. "Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease." *Nature* 349 (6311): 704–6. doi:10.1038/349704a0.
- Golde, T E., and C B. Eckman. 2001. "Cholesterol Modulation as an Emerging Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease." *Drug Discovery Today* 6 (20): 1049–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590033>.
- Gómez-Isla, T, R Hollister, H West, S Mui, J H Growdon, R C Petersen, J E Parisi, and B T Hyman. 1997. "Neuronal Loss Correlates with but Exceeds Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 41 (1): 17–24. doi:10.1002/ana.410410106.
- Gralle, Matthias, Michelle Gralle Botelho, and Fred S Wouters. 2009. "Neuroprotective Secreted Amyloid Precursor Protein Acts by Disrupting Amyloid Precursor Protein Dimers." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (22): 15016–25. doi:10.1074/jbc.M808755200.
- Gralle, Matthias, Cristiano L P Oliveira, Luiz H Guerreiro, William J McKinstry, Denise Galatis, Colin L Masters, Roberto Cappai, et al. 2006. "Solution Conformation and Heparin-Induced Dimerization of the Full-Length Extracellular Domain of the Human Amyloid Precursor Protein." *Journal of Molecular Biology* 357 (2): 493–508. doi:10.1016/j.jmb.2005.12.053.
- Grant, Marianne a, Noel D Lazo, Aleksey Lomakin, Margaret M Condron, Hiromi Arai, Ghiam Yamin, Alan C Rigby, and David B Teplow. 2007. "Familial Alzheimer's Disease Mutations Alter the Stability of the Amyloid Beta-Protein Monomer Folding Nucleus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (42): 16522–27. doi:10.1073/pnas.0705197104.
- Greenberg, S G, P Davies, J D Schein, and L I Binder. 1992. "Hydrofluoric Acid-Treated Tau PHF Proteins Display the Same Biochemical Properties as Normal Tau." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1): 564–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1370450>.
- Grimm, Marcus O W, Heike S Grimm, Andreas J P tzold, Eva G Zinser, Riikka Halonen,

- Marco Duering, Jakob A Tschäpe, et al. 2005. "Regulation of Cholesterol and Sphingomyelin Metabolism by Amyloid-Beta and Presenilin." *Nature Cell Biology* 7 (11): 1118–23. doi:10.1038/ncb1313.
- Grober, E, D Dickson, M J Sliwinski, H Buschke, M Katz, H Crystal, and R B Lipton. 1999. "Memory and Mental Status Correlates of Modified Braak Staging." *Neurobiology of Aging* 20 (6): 573–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10674422>.
- Grundke-Iqbal, I, K Iqbal, Y C Tung, M Quinlan, H M Wisniewski, and L I Binder. 1986. "Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4913–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3088567>.
- Grziwa, Beate, Marcus O W Grimm, Colin L. Masters, Konrad Beyreuther, Tobias Hartmann, and Stefan F. Lichtenthaler. 2003. "The Transmembrane Domain of the Amyloid Precursor Protein in Microsomal Membranes Is on Both Sides Shorter than Predicted." *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 6803–8. doi:10.1074/jbc.M210047200.
- Guardia-Laguarta, Cristina, Mireia Coma, Marta Pera, Jordi Clarimón, Lidia Sereno, José M. Agulló, Laura Molina-Porcel, et al. 2009. "Mild Cholesterol Depletion Reduces Amyloid- β Production by Impairing APP Trafficking to the Cell Surface." *Journal of Neurochemistry* 110 (1): 220–30. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06126.x.
- Haag, M D, A Hofman, P J Koudstaal, B H Stricker, and M M Breteler. 2009. "Statins Are Associated with a Reduced Risk of Alzheimer Disease regardless of Lipophilicity. The Rotterdam Study." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80 (1): 13–17. doi:jnnp.2008.150433 [pii]\n10.1136/jnnp.2008.150433.
- Haass, C, A Y Hung, D J Selkoe, and D B Teplow. 1994. "Mutations Associated with a Locus for Familial Alzheimer's Disease Result in Alternative Processing of Amyloid Beta-Protein Precursor." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (26): 17741–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8021287>.
- Haass, Christian, and Harald Steiner. 2002. "Alzheimer Disease Gamma-Secretase: A Complex Story of GxGD-Type Presenilin Proteases." *Trends in Cell Biology* 12 (12): 556–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495843>.
- Hanzal-Bayer, Michael F., and John F. Hancock. 2007. "Lipid Rafts and Membrane Traffic." *FEBS Letters* 581 (11): 2098–2104. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.019.
- Harada, A, K Oguchi, S Okabe, J Kuno, S Terada, T Ohshima, R Sato-Yoshitake, Y Takei, T Noda, and N Hirokawa. 1994. "Altered Microtubule Organization in Small-Calibre Axons of Mice Lacking Tau Protein." *Nature* 369 (6480): 488–91. doi:10.1038/369488a0.
- Hardy, J A, and G A Higgins. 1992. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis." *Science (New York, N.Y.)* 256 (5054): 184–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>.
- Hardy, John, and Dennis J Selkoe. 2002. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5580): 353–56. doi:10.1126/science.1072994.

- Harmeier, Anja, Christian Wozny, Benjamin R Rost, Lisa-Marie Munter, Haiqing Hua, Oleg Georgiev, Michael Beyermann, et al. 2009. "Role of Amyloid-Beta Glycine 33 in Oligomerization, Toxicity, and Neuronal Plasticity." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (23): 7582–90. doi:10.1523/JNEUROSCI.1336-09.2009.
- Harold, Denise, Richard Abraham, Paul Hollingworth, Rebecca Sims, Marian Hamshere, Jaspreet Singh Pahwa, Valentina Moskvina, et al. 2009. "Genome-Wide Association Study Identifies Variants at CLU and PICALM Associated with Alzheimer's Disease, and Shows Evidence for Additional Susceptibility Genes." *Nature Genetics* 41 (10): 1088–93. doi:10.1038/ng.440.Genome-wide.
- Harris, Faith M, Walter J Brecht, Qin Xu, Ina Tesseur, Lisa Kekoni, Tony Wyss-Coray, Jo Dee Fish, et al. 2003. "Carboxyl-Terminal-Truncated Apolipoprotein E4 Causes Alzheimer's Disease-like Neurodegeneration and Behavioral Deficits in Transgenic Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (19): 10966–71. doi:10.1073/pnas.1434398100.
- Hartmann, Tobias, Johanna Kuchenbecker, and Marcus O W Grimm. 2007. "Alzheimer's Disease: The Lipid Connection." *Journal of Neurochemistry* 103 Suppl (November): 159–70. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04715.x.
- Hashimoto, Mamoru, Hiroaki Kazui, Keiji Matsumoto, Yoko Nakano, Minoru Yasuda, and Etsuro Mori. 2005. "Does Donepezil Treatment Slow the Progression of Hippocampal Atrophy in Patients with Alzheimer's Disease?" *The American Journal of Psychiatry* 162 (4): 676–82. doi:10.1176/appi.ajp.162.4.676.
- Hashimoto, Tadafumi, Alberto Serrano-Pozo, Yukiko Hori, Kenneth W Adams, Shuko Takeda, Adrian Olaf Banerji, Akinori Mitani, et al. 2012. "Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid β Peptide." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (43): 15181–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012.
- Hattori, Chinatsu, Masashi Asai, Hayato Onishi, Noboru Sasagawa, Yasuhiro Hashimoto, Takaomi C Saido, Kei Maruyama, Shigehiko Mizutani, and Shoichi Ishiura. 2006. "BACE1 Interacts with Lipid Raft Proteins." *Journal of Neuroscience Research* 84 (4): 912–17. doi:10.1002/jnr.20981.
- Hayashi, Hideki, Robert B. Campenot, Dennis E. Vance, and Jean E. Vance. 2004. "Glial Lipoproteins Stimulate Axon Growth of Central Nervous System Neurons in Compartmented Cultures." *Journal of Biological Chemistry* 279 (14): 14009–15. doi:10.1074/jbc.M313828200.
- Hebert, L.E, Paul A Scherr, Judith J Mccann, Laurel A Beckett, and Denis A Evans. 2001. "Is the Risk of Developing Alzheimer ' S Disease Greater for Women than for Men ?" 153 (2): 132–36.
- Hebert, L.E, J Weuve, P A Scherr, and D A Evans. 2013. "Alzheimer Disease in the United States (2010-2050) Estimated Using the 2010 Census." *Neurol.* 80: 1778–83.
- Helmer, Catherine, Karine Pérès, Antoine Pariente, Florence Pasquier, Sophie Auriacombe, Michel Poncet, Florence Portet, et al. 2008. "Primary and Secondary Care Consultations in Elderly Demented Individuals in France. Results from the Three-City Study."

Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 26 (5): 407–15. doi:10.1159/000164692.

- Herzig, Martin C, Yvonne S Eisele, Matthias Staufenbiel, and Mathias Jucker. 2009. “E22Q-Mutant Abeta Peptide (AbetaDutch) Increases Vascular but Reduces Parenchymal Abeta Deposition.” *The American Journal of Pathology* 174 (3): 722–26. doi:10.2353/ajpath.2009.080790.
- Herzig, Martin C, David T Winkler, Patrick Burgermeister, Michelle Pfeifer, Esther Kohler, Stephen D Schmidt, Simone Danner, et al. 2004. “Abeta Is Targeted to the Vasculature in a Mouse Model of Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis.” *Nature Neuroscience* 7 (9): 954–60. doi:10.1038/nn1302.
- Hirokawa, N, Y Shiomura, and S Okabe. 1988. “Tau Proteins: The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules.” *The Journal of Cell Biology* 107 (4): 1449–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3139677>.
- Hirsch-Reinshagen, Veronica, Luis F. Maia, Biraydon L. Burgess, Jean Francois Blain, Kathryn E. Naus, Sean A. McIsaac, Pamela F. Parkinson, et al. 2005. “The Absence of ABCA1 Decreases Soluble ApoE Levels but Does Not Diminish Amyloid Deposition in Two Murine Models of Alzheimer Disease.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (52): 43243–56. doi:10.1074/jbc.M508781200.
- Hirsch-Reinshagen, Veronica, Steven Zhou, Braydon L. Burgess, Lise Bernier, Sean A. McIsaac, Jeniffer Y. Chan, Gavin H. Tansley, Jeffrey S. Cohn, Michael R. Hayden, and Cheryl L. Wellington. 2004. “Deficiency of ABCA1 Impairs Apolipoprotein E Metabolism in Brain.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 41197–207. doi:10.1074/jbc.M407962200.
- Hodges, John R. 2006. “Alzheimer’s Centennial Legacy: Origins, Landmarks and the Current Status of Knowledge Concerning Cognitive Aspects.” *Brain* 129 (11): 2811–22. doi:10.1093/brain/awl275.
- Hollingworth, Paul, Denise Harold, Rebecca Sims, Amy Gerrish, Jean-Charles Lambert, Minerva M Carrasquillo, Richard Abraham, et al. 2011. “Common Variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP Are Associated with Alzheimer’s Disease.” *Nature Genetics* 43 (5): 429–35. doi:10.1038/ng.803.
- Hosaka, Ai, Wataru Araki, Akiko Oda, Yasushi Tomidokoro, and Akira Tamaoka. 2013. “Statins Reduce Amyloid ??-Peptide Production by Modulating Amyloid Precursor Protein Maturation and Phosphorylation through a Cholesterol- Independent Mechanism in Cultured Neurons.” *Neurochemical Research* 38 (3): 589–600. doi:10.1007/s11064-012-0956-1.
- Hottin, Jérôme, Julien Moreau, Alain Bellemain, and Michael Canva. 2012. “Biochip Data Normalization Using Multifunctional Probes.” *The Analyst* 137 (13): 3119–25. doi:10.1039/c2an35120j.
- Hottin, Jérôme, Julien Moreau, Gisèle Roger, Jolanda Spadavecchia, Marie Claude Millot, Michel Goossens, and Michael Canva. 2007. “Plasmonic DNA: Towards Genetic Diagnosis Chips.” *Plasmonics* 2 (4): 201–15. doi:10.1007/s11468-007-9039-6.
- Hu, Xiaolan, Eve Pickering, Yingxue Cathy Liu, Stephanie Hall, Helene Fournier, Elyse Katz, Bryan Dechairo, Sally John, Paul van Eerdewegh, and Holly Soares. 2011. “Meta-

- Analysis for Genome-Wide Association Study Identifies Multiple Variants at the BIN1 Locus Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease." *PLoS ONE* 6 (2): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0016616.
- Hua, Xue, Alex D Leow, Suh Lee, Andrea D Klunder, Arthur W Toga, Natasha Lepore, Yi-Yu Chou, et al. 2008. "3D Characterization of Brain Atrophy in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Using Tensor-Based Morphometry." *NeuroImage* 41 (1): 19–34. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.02.010.
- Huang, Yadong, and Lennart Mucke. 2012. "Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Cell* 148 (6): 1204–22. doi:10.1016/j.cell.2012.02.040.
- Huang, Y, X Q Liu, T Wyss-Coray, W J Brecht, D a Sanan, and R W Mahley. 2001. "Apolipoprotein E Fragments Present in Alzheimer's Disease Brains Induce Neurofibrillary Tangle-like Intracellular Inclusions in Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8838–43. doi:10.1073/pnas.151254698.
- Hudry, E, D Van Dam, W Kulik, P P De Deyn, F S Stet, O Ahouansou, A Benraiss, et al. 2010. "Adeno-Associated Virus Gene Therapy with Cholesterol 24-Hydroxylase Reduces the Amyloid Pathology before or after the Onset of Amyloid Plaques in Mouse Models of Alzheimer's Disease." *Mol Ther* 18 (1). Nature Publishing Group: 44–53. doi:10.1038/mt.2009.175.
- Hussain, I, D Powell, D R Howlett, D G Tew, T D Meek, C Chapman, I S Gloger, et al. 1999. "Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as Beta-Secretase." *Molecular and Cellular Neurosciences* 14 (6): 419–27. doi:10.1006/mcne.1999.0811.
- Hutter-paier, Birgit, Henri J Huttunen, Luigi Puglielli, Christopher B Eckman, Doo Yeon Kim, Alexander Hofmeister, Robert D Moir, et al. 2004. "The ACAT Inhibitor CP-113 , 818 Markedly Reduces Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer ' S Disease 4500 San Pablo Road." *October* 44: 227–38.
- Hyman, B T, K Marzloff, and P V Arriagada. 1993. "The Lack of Accumulation of Senile Plaques or Amyloid Burden in Alzheimer's Disease Suggests a Dynamic Balance between Amyloid Deposition and Resolution." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 52 (6): 594–600. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229078>.
- Ignatius, M J, P J Gebicke-Härter, J H Skene, J W Schilling, K H Weisgraber, R W Mahley, and E M Shooter. 1986. "Expression of Apolipoprotein E during Nerve Degeneration and Regeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (4): 1125–29. doi:10.1073/pnas.83.4.1125.
- Ikonomovic, Milos D, William E Klunk, Eric E Abrahamson, Chester A Mathis, Julie C Price, Nicholas D Tsopelas, Brian J Lopresti, et al. 2008. "Post-Mortem Correlates of in Vivo PiB-PET Amyloid Imaging in a Typical Case of Alzheimer's Disease." *Brain : A Journal of Neurology* 131 (Pt 6): 1630–45. doi:10.1093/brain/awn016.
- Ingelsson, M, H Fukumoto, K L Newell, J H Growdon, E T Hedley-Whyte, M P Frosch, M S Albert, B T Hyman, and M C Irizarry. 2004. "Early Abeta Accumulation and Progressive Synaptic Loss, Gliosis, and Tangle Formation in AD Brain." *Neurology* 62 (6): 925–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15037694>.

- Innerarity, T L, and R W Mahley. 1978. "Enhanced Binding by Cultured Human Fibroblasts of Apo-E-Containing Lipoproteins as Compared with Low Density Lipoproteins." *Biochemistry* 17 (8): 1440–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/206278>.
- Iqbal, K, E Braak, H Braak, T Zaidi, and I Grundke-Iqbal. 1991. "A Silver Impregnation Method for Labeling Both Alzheimer Paired Helical Filaments and Their Polypeptides Separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Neurobiology of Aging* 12 (4): 357–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720514>.
- Iqbal, K, I Grundke-Iqbal, T Zaidi, P A Merz, G Y Wen, S S Shaikh, H M Wisniewski, I Alafuzoff, and B Winblad. 1986. "Defective Brain Microtubule Assembly in Alzheimer's Disease." *Lancet (London, England)* 2 (8504): 421–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2874414>.
- Ishizaki, T, N Hirayama, H Shinkawa, O Nimi, and Y Murooka. 1989. "Nucleotide Sequence of the Gene for Cholesterol Oxidase from a Streptomyces Sp." *Journal of Bacteriology* 171 (1): 596–601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2914858>.
- Itagaki, S, P L McGeer, H Akiyama, S Zhu, and D Selkoe. 1989. "Relationship of Microglia and Astrocytes to Amyloid Deposits of Alzheimer Disease." *Journal of Neuroimmunology* 24 (3): 173–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2808689>.
- Ito, Toshimitsu. 2003. "Physiological Function of ABCG1." *Drug News & Perspectives* 16 (8): 490–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668945>.
- Iwata, N, S Tsubuki, Y Takaki, K Watanabe, M Sekiguchi, E Hosoki, M Kawashima-Morishima, et al. 2000. "Identification of the Major Abeta1-42-Degrading Catabolic Pathway in Brain Parenchyma: Suppression Leads to Biochemical and Pathological Deposition." *Nature Medicine* 6: 143–50. doi:10.1038/72237.
- Jack, C.R, David A Bennett, Kaj Blennow, Maria C Carrillo, Howard H Feldman, Giovanni B Frisoni, Harald Hampel, et al. 2016. "A/T/N: An Unbiased Descriptive Classification Scheme for Alzheimer Disease Biomarkers." *Neurology* 87 (5): 539–47. doi:10.1212/WNL.0000000000002923.
- Jack, C.R, and David M Holtzman. 2013. "Biomarker Modeling of Alzheimer ' S Disease." *Neuron* 80 (6): 1347–58. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.003.
- Jack, C.R, R C Petersen, Y Xu, P C O'Brien, G E Smith, R J Ivnik, B F Boeve, E G Tangalos, and E Kokmen. 2000. "Rates of Hippocampal Atrophy Correlate with Change in Clinical Status in Aging and AD." *Neurology* 55 (4): 484–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953178>.
- Jack, C.R, Ronald C Petersen, Michael Grundman, Shelia Jin, Anthony Gamst, Chadwick P Ward, Drahomira Sencakova, Rachelle S Doody, Leon J Thal, and Members of the Alzheimer's Disease Cooperative Study (ADCS). 2008. "Longitudinal MRI Findings from the Vitamin E and Donepezil Treatment Study for MCI." *Neurobiology of Aging* 29 (9): 1285–95. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.004.
- Jack, C.R, M M Shiung, J L Gunter, P C O'Brien, S D Weigand, D S Knopman, B F Boeve, et al. 2004. "Comparison of Different MRI Brain Atrophy Rate Measures with Clinical Disease Progression in AD." *Neurology* 62 (4): 591–600. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981176>.

- Jagust, W.J, Dan Bandy, Kewei Chen, Norman L Foster, Susan M Landau, Chester A Mathis, Julie C Price, et al. 2010. "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Positron Emission Tomography Core." *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 6 (3): 221–29. doi:10.1016/j.jalz.2010.03.003.
- Jagust, W J, S M Landau, L M Shaw, J Q Trojanowski, R A Koeppe, E M Reiman, N L Foster, et al. 2009. "Relationships between Biomarkers in Aging and Dementia." *Neurology* 73 (15): 1193–99. doi:10.1212/WNL.0b013e3181bc010c.
- Jain, Sachi, Seo Yeon Yoon, Laura Leung, Johanna Knoferle, and Yadong Huang. 2013. "Cellular Source-Specific Effects of Apolipoprotein (Apo) E4 on Dendrite Arborization and Dendritic Spine Development." *PLoS ONE* 8 (3): 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0059478.
- Jamin, Nadège, Jean-Michel Neumann, Mariano A Ostuni, Thi Kim Ngoc Vu, Zhi-Xing Yao, Samuel Murail, Jean-Claude Robert, Christoforos Giatzakis, Vassilios Papadopoulos, and Jean-Jacques Lacapère. 2005. "Characterization of the Cholesterol Recognition Amino Acid Consensus Sequence of the Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (3): 588–94. doi:10.1210/me.2004-0308.
- Jansen, Paula J., Dieter Lütjohann, Karin M. Thelen, Klaus Von Bergmann, Fred Van Leuven, Frans C S Ramaekers, and Monique Monique. 2009. "Absence of ApoE Upregulates Murine Brain ApoD and ABCA1 Levels, but Does Not Affect Brain Sterol Levels, While Human ApoE3 and Human ApoE4 Upregulate Brain Cholesterol Precursor Levels." *Journal of Alzheimer's Disease* 18 (2): 319–29. doi:10.3233/JAD-2009-1150.
- Janson, J., T. Laedtke, J. E. Parisi, P. O'Brien, R. C. Petersen, and P. C. Butler. 2004. "Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease." *Diabetes* 53 (2): 474–81. doi:10.2337/diabetes.53.2.474.
- Jarvik, G P, E M Wijsman, W a Kukull, G D Schellenberg, C Yu, and E B Larson. 1995. "Interactions of Apolipoprotein E Genotype, Total Cholesterol Level, Age, and Sex in Prediction of Alzheimer's Disease: A Case-Control Study." *Neurology* 45 (6): 1092–96. doi:10.1212/WNL.45.6.1092.
- Ji, Z S, W J Brecht, R D Miranda, M M Hussain, T L Innerarity, and R W Mahley. 1993. "Role of Heparan Sulfate Proteoglycans in the Binding and Uptake of Apolipoprotein E-Enriched Remnant Lipoproteins by Cultured Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (14): 10160–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683668>.
- Jiang, Qingguang, C Y Daniel Lee, Shweta Mandrekar, Brandy Wilkinson, Paige Cramer, Noam Zelcer, Karen Mann, et al. 2008. "ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβeta." *Neuron* 58 (5): 681–93. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.010.
- Jick, H, GL L Zornberg, SS S Jick, S Seshadri, and DA A Drachman. 2000. "Statins and the Risk of Dementia." *Lancet* 356 (9242): 1627–31. doi:10.1016/S0140-6736(00)03155-X.
- Jin, Ming, Nina Shepardson, Ting Yang, Gang Chen, Dominic Walsh, and Dennis J Selkoe. 2011. "Soluble Amyloid Beta-Protein Dimers Isolated from Alzheimer Cortex Directly Induce Tau Hyperphosphorylation and Neuritic Degeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (14): 5819–24. doi:10.1073/pnas.1017033108.

- Johnston, J A, R F Cowburn, S Norgren, B Wiehager, N Venizelos, B Winblad, C Vigo-Pelfrey, D Schenk, L Lannfelt, and C O'Neill. 1994. "Increased Beta-Amyloid Release and Levels of Amyloid Precursor Protein (APP) in Fibroblast Cell Lines from Family Members with the Swedish Alzheimer's Disease APP670/671 Mutation." *FEBS Letters* 354 (3): 274–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957938>.
- Jones, Phillip B., Kenneth W. Adams, Anete Rozkalne, Tara L. Spires-Jones, Tammy T. Hshieh, Tadafumi Hashimoto, Christine A F von Armin, Mathew Mielke, Brian J. Bacskai, and Bradley T. Hyman. 2011. "Apolipoprotein E: Isoform Specific Differences in Tertiary Structure and Interaction with Amyloid-?? In Human Alzheimer Brain." *PLoS ONE* 6 (1): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0014586.
- Jonsson, Thorlakur, Jasvinder K. Atwal, Stacy Steinberg, Jon Snaedal, Palmi V. Jonsson, Sigurbjorn Bjornsson, Hreinn Stefansson, et al. 2012. "A Mutation in APP Protects against Alzheimer's Disease and Age-Related Cognitive Decline." *Nature* 488 (7409): 96–99. doi:10.1038/nature11283.
- Jung, Joo In, Sasha Premraj, Pedro E. Cruz, Thomas B. Ladd, Yewon Kwak, Edward H. Koo, Kevin M. Felsenstein, Todd E. Golde, and Yong Ran. 2014. "Independent Relationship between Amyloid Precursor Protein (APP) Dimerization and γ -Secretase Processivity." *PLoS ONE* 9 (10). doi:10.1371/journal.pone.0111553.
- Jung, Joo In, Yong Ran, Pedro E. Cruz, Awilda M. Rosario, Thomas B. Ladd, Thomas L. Kukar, Edward H. Koo, Kevin M. Felsenstein, and Todd E. Golde. 2014. "Complex Relationships between Substrate Sequence and Sensitivity to Alterations in ??-Secretase Processivity Induced by ??-Secretase Modulators." *Biochemistry* 53 (12): 1947–57. doi:10.1021/bi401521t.
- Kaden, Daniela, Lisa Marie Munter, Mangesh Joshi, Carina Treiber, Christoph Weise, Tobias Bethge, Philipp Voigt, et al. 2008. "Homophilic Interactions of the Amyloid Precursor Protein (APP) Ectodomain Are Regulated by the Loop Region and Affect ??-Secretase Cleavage of APP." *Journal of Biological Chemistry* 283 (11): 7271–79. doi:10.1074/jbc.M708046200.
- Kakio, Atsuko, Sei-ichi Nishimoto, Yasunori Kozutsumi, and Katsumi Matsuzaki. 2003. "Formation of a Membrane-Active Form of Amyloid Beta-Protein in Raft-like Model Membranes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303 (2): 514–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12659848>.
- Kakio, Atsuko, Sei-ichi Nishimoto, Katsuhiko Yanagisawa, Yasunori Kozutsumi, and Katsumi Matsuzaki. 2002. "Interactions of Amyloid Beta-Protein with Various Gangliosides in Raft-like Membranes: Importance of GM1 Ganglioside-Bound Form as an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid." *Biochemistry* 41 (23): 7385–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044171>.
- Kaminski, W E, E Orsó, W Diederich, J Klucken, W Drobnik, and G Schmitz. 2000. "Identification of a Novel Human Sterol-Sensitive ATP-Binding Cassette Transporter (ABCA7)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (2): 532–38. doi:10.1006/bbrc.2000.2954.
- Kanekiyo, Takahisa, and Guojun Bu. 2014. "The Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 and Amyloid-?? Clearance in Alzheimer's Disease." *Frontiers in Aging Neuroscience* 6 (MAY): 1–12. doi:10.3389/fnagi.2014.00093.

- Kang, J, H G Lemaire, A Unterbeck, J M Salbaum, C L Masters, K H Grzeschik, G Multhaup, K Beyreuther, and B Müller-Hill. 1987. "The Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Protein Resembles a Cell-Surface Receptor." *Nature* 325 (6106): 733–36. doi:10.1038/325733a0.
- Kang, Min Kyung, Jeewon Lee, Anh H Nguyen, and Sang Jun Sim. 2015. "Label-Free Detection of ApoE4-Mediated β -Amyloid Aggregation on Single Nanoparticle Uncovering Alzheimer's Disease." *Biosensors & Bioelectronics* 72 (October): 197–204. doi:10.1016/j.bios.2015.05.017.
- Karch, Celeste M, and Alison M Goate. 2015. "Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis." *Biological Psychiatry* 77 (1): 43–51. doi:10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
- Kariv-Inbal, Zehavit, Shiri Yacobson, Robert Berkecz, Maria Peter, Tamas Janaky, Dieter Lütjohann, Laus M Broersen, Tobias Hartmann, and Daniel M Michaelson. 2012. "The Isoform-Specific Pathological Effects of apoE4 in Vivo Are Prevented by a Fish Oil (DHA) Diet and Are Modified by Cholesterol." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 28 (3): 667–83. doi:10.3233/JAD-2011-111265.
- Kidd, M. 1963. "Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease." *Nature* 197 (January): 192–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14032480>.
- . 1964. "ALZHEIMER'S DISEASE--AN ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY." *Brain : A Journal of Neurology* 87 (June): 307–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14188276>.
- Kienlen-Campard, Pascal, Bernadette Tasiaux, Joanne Van Hees, Mingli Li, Sandra Huysseune, Takeshi Sato, Jeffrey Z. Fei, et al. 2008. "Amyloidogenic Processing but Not Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular C-Terminal Domain Production Requires a Precisely Oriented APP Dimer Assembled by Transmembrane GXXXG Motifs." *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7733–44. doi:10.1074/jbc.M707142200.
- Kim, D H, H Iijima, K Goto, J Sakai, H Ishii, H J Kim, H Suzuki, H Kondo, S Saeki, and T Yamamoto. 1996. "Human Apolipoprotein E Receptor 2. A Novel Lipoprotein Receptor of the Low Density Lipoprotein Receptor Family Predominantly Expressed in Brain." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (14): 8373–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626535>.
- Kim, Jungsu, Joseph M. Castellano, Hong Jiang, Jacob M. Basak, Maia Parsadanian, Vi Pham, Stephanie M. Mason, Steven M. Paul, and David M. Holtzman. 2009. "Overexpression of Low-Density Lipoprotein Receptor in the Brain Markedly Inhibits Amyloid Deposition and Increases Extracellular A β Clearance." *Neuron* 64 (5). Elsevier Ltd: 632–44. doi:10.1016/j.neuron.2009.11.013.
- Kim, Jungsu, Adam E M Eltorai, Hong Jiang, Fan Liao, Philip B Verghese, Jaekwang Kim, Floy R Stewart, Jacob M Basak, and David M Holtzman. 2012. "Anti-apoE Immunotherapy Inhibits Amyloid Accumulation in a Transgenic Mouse Model of A β Amyloidosis." *The Journal of Experimental Medicine* 209 (12): 2149–56. doi:10.1084/jem.20121274.
- Kimberly, W Taylor, Matthew J LaVoie, Beth L Ostaszewski, Wenjuan Ye, Michael S Wolfe, and Dennis J Selkoe. 2003. "Gamma-Secretase Is a Membrane Protein Complex

Comprised of Presenilin, Nicastrin, Aph-1, and Pen-2.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (11): 6382–87.
doi:10.1073/pnas.1037392100.

Kinet, J P, U Blank, C Ra, K White, H Metzger, and J Kochan. 1988. “Isolation and Characterization of cDNAs Coding for the Beta Subunit of the High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (17): 6483–87.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Kivipelto, M., E L Helkala, M P Laakso, T Hänninen, M Hallikainen, K Alhainen, H Soininen, J Tuomilehto, and A Nissinen. 2001. “Midlife Vascular Risk Factors and Alzheimer’s Disease in Later Life: Longitudinal, Population Based Study.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 322 (7300): 1447–51.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408299>.

Kivipelto, Miia, Eeva-liisa Helkala, Mikko P Laakso, Tuomo Hänninen, Merja Hallikainen, Kari Alhainen, Hilka Soininen, Jaakko Tuomilehto, and Aulikki Nissien. 2001. “Later Life : Longitudinal , Population Based Study.” *Bmj* 322 (June): 1447–51.

Klajnert, Barbara, Marta Cortijo-Arellano, Maria Bryszewska, and Josep Cladera. 2006. “Influence of Heparin and Dendrimers on the Aggregation of Two Amyloid Peptides Related to Alzheimer’s and Prion Diseases.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339 (2): 577–82. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.053.

Klunk, William E, Henry Engler, Agneta Nordberg, Yanming Wang, Gunnar Blomqvist, Daniel P Holt, Mats Bergström, et al. 2004. “Imaging Brain Amyloid in Alzheimer’s Disease with Pittsburgh Compound-B.” *Annals of Neurology* 55 (3): 306–19.
doi:10.1002/ana.20009.

Knittweis, J W, and W A McMullen. 2000. “The Effect of apoE on Dementia Is Not through Atherosclerosis: The Rotterdam Study.” *Neurology* 54 (12): 2356–58.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10881278>.

Knowles, R B, C Wyart, S V Buldyrev, L Cruz, B Urbanc, M E Hasselmo, H E Stanley, and B T Hyman. 1999. “Plaque-Induced Neurite Abnormalities: Implications for Disruption of Neural Networks in Alzheimer’s Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9): 5274–79. doi:10.1073/pnas.96.9.5274.

Koistinaho, Milla, Suizhen Lin, Xin Wu, Michail Esterman, Deanna Koger, Jeffrey Hanson, Richard Higgs, et al. 2004. “Apolipoprotein E Promotes Astrocyte Colocalization and Degradation of Deposited Amyloid-Beta Peptides.” *Nature Medicine* 10 (7): 719–26.
doi:10.1038/nm1058.

Kojro, E, G Gimpl, S Lammich, W Marz, and F Fahrenholz. 2001. “Low Cholesterol Stimulates the Nonamyloidogenic Pathway by Its Effect on the Alpha -Secretase ADAM 10.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (10): 5815–20. doi:10.1073/pnas.081612998.

Kölsch, H., R. Heun, A. Kerksiek, K. V. Bergmann, W. Maier, and D. Lütjohann. 2004. “Altered Levels of Plasma 24S- and 27-Hydroxycholesterol in Demented Patients.” *Neuroscience Letters* 368 (3): 303–8. doi:10.1016/j.neulet.2004.07.031.

- Koper, J W, E C Zeinstra, M Lopes-Cardozo, and L M van Golde. 1984. "Acetoacetate and Glucose as Substrates for Lipid Synthesis by Rat Brain Oligodendrocytes and Astrocytes in Serum-Free Culture." *Biochimica et Biophysica Acta* 796 (1): 20–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6487643>.
- Kotti, Tiina J, Denise M O Ramirez, Brad E Pfeiffer, Kimberly M Huber, and David W Russell. 2006. "Brain Cholesterol Turnover Required for Geranylgeraniol Production and Learning in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10): 3869–74. doi:10.1073/pnas.0600316103.
- Kowal, R C, J Herz, J L Goldstein, V Esser, and M S Brown. 1989. "Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediates Uptake of Cholesteryl Esters Derived from Apoprotein E-Enriched Lipoproteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (15): 5810–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762297>.
- Kremer, J J, M M Pallitto, D J Sklansky, and R M Murphy. 2000. "Correlation of Beta-Amyloid Aggregate Size and Hydrophobicity with Decreased Bilayer Fluidity of Model Membranes." *Biochemistry* 39 (33): 10309–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956020>.
- Krugers, H J, M Mulder, J Korf, L Havekes, E R de Kloet, and M Joëls. 1997. "Altered Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Area of Apolipoprotein E Deficient Mice." *Neuroreport* 8 (11): 2505–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9261817>.
- Kukar, Thomas L., Thomas B. Ladd, Paul Robertson, Sean A. Pintchovski, Brenda Moore, Maralyssa A. Bann, Zhao Ren, et al. 2011. "Lysine 624 of the Amyloid Precursor Protein (APP) Is a Critical Determinant of Amyloid ?? Peptide Length: Support for a Sequential Model of ??-Secretase Intramembrane Proteolysis and Regulation by the Amyloid ?? Precursor Protein (APP) Juxtamembrane Regio." *Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 39804–12. doi:10.1074/jbc.M111.274696.
- Kuo, Y M, M R Emmerling, C L Bisgaier, A D Essenburg, H C Lampert, D Drumm, and A E Roher. 1998. "Elevated Low-Density Lipoprotein in Alzheimer's Disease Correlates with Brain A β 1-42 Levels." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252 (3): 711–15. doi:10.1006/bbrc.1998.9652.
- Kurata, Tomoko, Kazunori Miyazaki, Miki Kozuki, Violeta Lukic Panin, Nobutoshi Morimoto, Yasuyuki Ohta, Makiko Nagai, Yoshio Ikeda, Tohru Matsuura, and Koji Abe. 2011. "Atorvastatin and Pitavastatin Improve Cognitive Function and Reduce Senile Plaque and Phosphorylated Tau in Aged APP Mice." *Brain Research* 1371: 161–70. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.067.
- Kurinami, Hitomi, Naoyuki Sato, Mitsuru Shinohara, Daisuke Takeuchi, Shuko Takeda, Munehisa Shimamura, Toshio Ogihara, and Ryuichi Morishita. 2008. "Prevention of Amyloid Beta-Induced Memory Impairment by Fluvastatin, Associated with the Decrease in Amyloid Beta Accumulation and Oxidative Stress in Amyloid Beta Injection Mouse Model." *International Journal of Molecular Medicine* 21: 531–37.
- Lambert, Jean-Charles, Simon Heath, Gael Even, Dominique Campion, Kristel Slegers, Mikko Hiltunen, Onofre Combarros, et al. 2009. "Genome-Wide Association Study Identifies Variants at CLU and CR1 Associated with Alzheimer's Disease." *Nature Genetics* 41 (10): 1094–99. doi:10.1038/ng.439.

- Lange, Yvonne, Jin Ye, and Francisco Strelow. 1995. "Movement of 25-Hydroxycholesterol from the Plasma Membrane to the Rough Endoplasmic Reticulum in C6 glioma Cells." *Journal of Lipid Research* 36: 1092–97.
- Launer, L J, G W Ross, H Petrovitch, K Masaki, D Foley, L R White, and R J Havlik. 2000. "Midlife Blood Pressure and Dementia: The Honolulu-Asia Aging Study." *Neurobiology of Aging* 21 (1): 49–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794848>.
- Lazar, Adina N., Claudia Bich, Maï Panchal, Nicolas Desbenoit, Vanessa W. Petit, David Touboul, Luce Dauphinot, et al. 2013. "Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) Imaging Reveals Cholesterol Overload in the Cerebral Cortex of Alzheimer Disease Patients." *Acta Neuropathologica* 125 (1): 133–44. doi:10.1007/s00401-012-1041-1.
- Lee, M-S., Shih-Chu Kao, Cynthia A Lemere, Weiming Xia, Huang-Chun Tseng, Ying Zhou, Rachael Neve, Michael K Ahljianian, and Li-Huei Tsai. 2003. "APP Processing Is Regulated by Cytoplasmic Phosphorylation." *The Journal of Cell Biology* 163 (1): 83–95. doi:10.1083/jcb.200301115.
- Lee, S J, U Liyanage, P E Bickel, W Xia, P T Lansbury, and K S Kosik. 1998. "A Detergent-Insoluble Membrane Compartment Contains Aβ in Vivo." *Nature Medicine* 4 (6): 730–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9623986>.
- Leibson, C L, W A Rocca, V A Hanson, R Cha, E Kokmen, P C O'Brien, and P J Palumbo. 1997. "The Risk of Dementia among Persons with Diabetes Mellitus: A Population-Based Cohort Study." *Annals of the New York Academy of Sciences* 826 (September): 422–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9329716>.
- Leissring, Malcolm A., Wesley Farris, Alice Y. Chang, Dominic M. Walsh, Xining Wu, Xiaoyan Sun, Matthew P. Frosch, and Dennis J. Selkoe. 2003. "Enhanced Proteolysis of Aβ-Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology, and Premature Death." *Neuron* 40 (6): 1087–93. doi:10.1016/S0896-6273(03)00787-6.
- Lemmon, M a, J M Flanagan, H R Treutlein, J Zhang, and D M Engelman. 1992. "Sequence Specificity in the Dimerization of Transmembrane Alpha Helices." *Biochemistry* 31 (51): 12719–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1463743.
- Leoni, Valerio, and Claudio Caccia. 2013. "24S-Hydroxycholesterol in Plasma: A Marker of Cholesterol Turnover in Neurodegenerative Diseases." *Biochimie* 95 (3). Elsevier Masson SAS: 595–612. doi:10.1016/j.biochi.2012.09.025.
- Levin-Allerhand, J A, C E Lominska, and J D Smith. 2002. "Increased Amyloid- Levels in APPSWE Transgenic Mice Treated Chronically with a Physiological High-Fat High-Cholesterol Diet." *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 6 (5): 315–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12474021>.
- Levy-Lahad, E, W Wasco, P Poorkaj, D M Romano, J Oshima, W H Pettingell, C E Yu, P D Jondro, S D Schmidt, and K Wang. 1995. "Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5226): 973–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638622>.

- Levy, E, M D Carman, I J Fernandez-Madrid, M D Power, I Lieberburg, S G van Duinen, G T Bots, W Luyendijk, and B Frangione. 1990. "Mutation of the Alzheimer's Disease Amyloid Gene in Hereditary Cerebral Hemorrhage, Dutch Type." *Science (New York, N.Y.)* 248 (4959): 1124–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2111584>.
- Lewczuk, Piotr, Wolfgang Maier, Julius Popp, Sabrina Meichsner, Heike Ko, Johannes Kornhuber, Frank Jessen, and Dieter Lu. 2013. "Cerebral and Extracerebral Cholesterol Metabolism and CSF Markers of Alzheimer ' S Disease" 86: 37–42. doi:10.1016/j.bcp.2012.12.007.
- Lewis, J, D W Dickson, W L Lin, L Chisholm, A Corral, G Jones, S H Yen, et al. 2001. "Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP." *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534): 1487–91. doi:10.1126/science.1058189.
- Li, Gang, Nga Bien-Ly, Yaisa Andrews-Zwilling, Qin Xu, Aubrey Bernardo, Karen Ring, Brian Halabisky, Changhui Deng, Robert W. Mahley, and Yadong Huang. 2009. "GABAergic Interneuron Dysfunction Impairs Hippocampal Neurogenesis in Adult Apolipoprotein E4 Knockin Mice." *Cell Stem Cell* 5 (6). Elsevier Ltd: 634–45. doi:10.1016/j.stem.2009.10.015.
- Li, H, and V Papadopoulos. 1998. "Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Cholesterol Recognition/interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern." *Endocrinology* 139 (12): 4991–97. doi:10.1210/endo.139.12.6390.
- Li, Jie, Takahisa Kanekiyo, Mitsuru Shinohara, Yunwu Zhang, Mary Jo LaDu, Huaxi Xu, and Guojun Bu. 2012. "Differential Regulation of Amyloid- β Endocytic Trafficking and Lysosomal Degradation by Apolipoprotein E Isoforms." *Journal of Biological Chemistry* 287 (53): 44593–601. doi:10.1074/jbc.M112.420224.
- Li, Y, L W Chu, Y Q Chen, B M Y Cheung, R Y H Leung, P Y Yik, K M Ng, et al. 2006. "Intron 2 (T/C) CYP46 Polymorphism Is Associated with Alzheimer's Disease in Chinese Patients." *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 22 (5–6): 399–404. doi:10.1159/000095723.
- Liao, Fan, Yukiko Hori, Eloise Hudry, Adam Q Bauer, Hong Jiang, Thomas E Mahan, Katheryn B Lefton, et al. 2014. "Anti-ApoE Antibody Given after Plaque Onset Decreases A β Accumulation and Improves Brain Function in a Mouse Model of A β Amyloidosis." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (21): 7281–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.0646-14.2014.
- Lin, C T, Y F Xu, J Y Wu, and L Chan. 1986. "Immunoreactive Apolipoprotein E Is a Widely Distributed Cellular Protein. Immunohistochemical Localization of Apolipoprotein E in Baboon Tissues." *The Journal of Clinical Investigation* 78 (4): 947–58. doi:10.1172/JCI112685.
- Lin, Kun Ju, Wen Chuin Hsu, Ing Tsung Hsiao, Shiaw Pyng Wey, Lee Way Jin, Daniel Skovronsky, Yau Yau Wai, et al. 2010. "Whole-Body Biodistribution and Brain PET Imaging with [18F]AV-45, a Novel Amyloid Imaging Agent - a Pilot Study." *Nuclear Medicine and Biology* 37 (4): 497–508. doi:10.1016/j.nucmedbio.2010.02.003.
- Lins, L, M Decaffmeyer, A Thomas, and R Brasseur. 2008. "Relationships between the Orientation and the Structural Properties of Peptides and Their Membrane Interactions."

- Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (7–8): 1537–44.
doi:10.1016/j.bbamem.2008.04.006.
- Lithgow, Stephen, Graham A Jackson, and Debbie Browne. 2012. “Estimating the Prevalence of Dementia: Cognitive Screening in Glasgow Nursing Homes.” *International Journal of Geriatric Psychiatry* 27 (8): 785–91. doi:10.1002/gps.2784.
- Liu, Chia-Chen, Chia-Chan Liu, Takahisa Kanekiyo, Huaxi Xu, and Guojun Bu. 2013. “Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy.” *Nature Reviews. Neurology* 9 (2): 106–18. doi:10.1038/nrneurol.2012.263.
- Liu, Qiang, Celina V Zerbinatti, Juan Zhang, Hyang-Sook Hoe, Baiping Wang, Sarah L Cole, Joachim Herz, Louis Muglia, and Guojun Bu. 2007. “Amyloid Precursor Protein Regulates Brain Apolipoprotein E and Cholesterol Metabolism through Lipoprotein Receptor LRP1.” *Neuron* 56 (1): 66–78. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.008.
- Ljungberg, M Cecilia, Rejith Dayanandan, Ayodeji Asuni, Tom H Rupniak, Brian H Anderton, and Simon Lovestone. 2002. “Truncated apoE Forms Tangle-like Structures in a Neuronal Cell Line.” *Neuroreport* 13 (6): 867–70.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997703>.
- Löffler, Tina, Stefanie Flunkert, Magdalena Temmel, and Birgit Hutter-Paier. 2016. “Decreased Plasma A β in Hyperlipidemic APPSL Transgenic Mice Is Associated with BBB Dysfunction.” *Frontiers in Neuroscience* 10 (JUN): 1–8.
doi:10.3389/fnins.2016.00232.
- López, Cesar A, Alex H de Vries, and Siewert J Marrink. 2011. “Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction.” *PLoS Computational Biology* 7 (3): e1002020. doi:10.1371/journal.pcbi.1002020.
- Luchsinger, Jose A, Ming-xin Tang, Yaakov Stern, Steven Shea, and Richard Mayeux. 2001. “Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer ’ S Disease and Dementia with Stroke in a Multiethnic Cohort.” *American Journal of Epidemiology* 154 (7): 635–41.
doi:10.1093/aje/154.7.635.
- Lund, E.G., J M Guileyardo, and D W Russell. 1999. “cDNA Cloning of Cholesterol 24-Hydroxylase, a Mediator of Cholesterol Homeostasis in the Brain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (13): 7238–43.
doi:10.1073/pnas.96.13.7238.
- Lund, Erik G., Chonglun Xie, Tiina Kotti, Stephen D. Turley, John M. Dietschy, and David W. Russell. 2003. “Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals a Brain-Specific Mechanism of Cholesterol Turnover.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22980–88. doi:10.1074/jbc.M303415200.
- Lütjohann, D, and K von Bergmann. 2003. “24S-Hydroxycholesterol: A Marker of Brain Cholesterol Metabolism.” *Pharmacopsychiatry* 36 Suppl 2 (September): S102-6.
doi:10.1055/s-2003-43053.
- Luyendijk, W, and G T Bots. 1986. “Hereditary Cerebral Hemorrhage.” *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 46 (4): 391.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3726447>.
- Lynch, Danielle K., Stephanie C. Winata, Ruth J. Lyons, William E. Hughes, Gillian M.

- Lehrbach, Valerie Wasinger, Garry Corthals, Stuart Cordwell, and Roger J. Daly. 2003. "A Cortactin-CD2-Associated Protein (CD2AP) Complex Provides a Novel Link between Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis and the Actin Cytoskeleton." *Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21805–13. doi:10.1074/jbc.M211407200.
- Lyons, Anthony, Kevin J Murphy, Rachael Clarke, and Marina a Lynch. 2011. "Atorvastatin Prevents Age-Related and Amyloid- β -Induced Microglial Activation by Blocking Interferon- γ Release from Natural Killer Cells in the Brain." *Journal of Neuroinflammation* 8 (1): 27. doi:10.1186/1742-2094-8-27.
- Ma, J, A Yee, H B Brewer, S Das, and H Potter. 1994. "Amyloid-Associated Proteins Alpha 1-Antichymotrypsin and Apolipoprotein E Promote Assembly of Alzheimer Beta-Protein into Filaments." *Nature* 372 (6501): 92–94. doi:10.1038/372092a0.
- Ma, S L, N L Tang, L C Lam, and H F Chiu. 2006. "Polymorphisms of the Cholesterol 24-Hydroxylase (CYP46A1) Gene and the Risk of Alzheimer's Disease in a Chinese Population." *Int Psychogeriatr* 18 (1): 37–45. doi:S1041610205003108 [pii]r10.1017/S1041610205003108.
- Maioli, Silvia, Ann Båvner, Zeina Ali, Maura Heverin, Muhammad-Al-Mustafa Ismail, Elena Puerta, Maria Olin, et al. 2013. "Is It Possible to Improve Memory Function by Upregulation of the Cholesterol 24S-Hydroxylase (CYP46A1) in the Brain?" *PloS One* 8 (7): e68534. doi:10.1371/journal.pone.0068534.
- Maloney, Janice A., Travis Bainbridge, Amy Gustafson, Shuo Zhang, Roxanne Kyauk, Pascal Steiner, Marcel Van Der Brug, et al. 2014. "Molecular Mechanisms of Alzheimer Disease Protection by the A673T Allele of Amyloid Precursor Protein." *Journal of Biological Chemistry* 289 (45): 30990–0. doi:10.1074/jbc.M114.589069.
- Mandelkow, Eva-Maria, and Eckhard Mandelkow. 2012. "Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7): a006247. doi:10.1101/cshperspect.a006247.
- Mandrekar, Shweta, Qingguang Jiang, C Y Daniel Lee, Jessica Koenigs-knecht-Talboo, David M Holtzman, and Gary E Landreth. 2009. "Microglia Mediate the Clearance of Soluble A β through Fluid Phase Macropinocytosis." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (13): 4252–62. doi:10.1523/JNEUROSCI.5572-08.2009.
- Manelli, Arlene M, Lindsey C Bulfinch, Patrick M Sullivan, and Mary Jo LaDu. 2007. "A β 42 Neurotoxicity in Primary Co-Cultures: Effect of apoE Isoform and A β Conformation." *Neurobiology of Aging* 28 (8): 1139–47. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.024.
- Marenchino, Marco, Philip T F Williamson, Samuel Murri, Giorgia Zandomenighi, Heidi Wunderli-Allenspach, Beat H Meier, and Stefanie D Krämer. 2008. "Dynamics and Cleavability at the Alpha-Cleavage Site of APP(684-726) in Different Lipid Environments." *Biophysical Journal* 95 (3): 1460–73. doi:10.1529/biophysj.108.129726.
- Marquer, Catherine, Viviane Devauges, Jack-Christophe Cossec, Géraldine Liot, Sandrine Lécart, Frédéric Saudou, Charles Duyckaerts, Sandrine Lévêque-Fort, and Marie-Claude Potier. 2011. "Local Cholesterol Increase Triggers Amyloid Precursor Protein-Bace1 Clustering in Lipid Rafts and Rapid Endocytosis." *FASEB Journal : Official Publication*

of the Federation of American Societies for Experimental Biology 25 (4): 1295–1305.
doi:10.1096/fj.10-168633.

- Marquer, Catherine, Jeanne Laine, Luce Dauphinot, Linda Hanbouch, Camille Lemercier-Neuillet, Nathalie Pierrot, Koen Bossers, et al. 2014. “Increasing Membrane Cholesterol of Neurons in Culture Recapitulates Alzheimer’s Disease Early Phenotypes.” *Molecular Neurodegeneration* 9: 60. doi:10.1186/1750-1326-9-60.
- Marquer, Catherine, Sandrine Lévêque-Fort, and Marie-Claude Potier. 2012. “Determination of Lipid Raft Partitioning of Fluorescently-Tagged Probes in Living Cells by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS).” *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 62 (62): e3513. doi:10.3791/3513.
- Martin, Ludovic, Xenia Latypova, and Faraj Terro. 2011. “Post-Translational Modifications of Tau Protein: Implications for Alzheimer’s Disease.” *Neurochemistry International* 58 (4): 458–71. doi:10.1016/j.neuint.2010.12.023.
- Martínez-Morillo, Eduardo, Oskar Hansson, Yuka Atagi, Guojun Bu, Lennart Minthon, Eleftherios P. Diamandis, and Henrietta M. Nielsen. 2014. “Total Apolipoprotein E Levels and Specific Isoform Composition in Cerebrospinal Fluid and Plasma from Alzheimer’s Disease Patients and Controls.” *Acta Neuropathologica* 127 (5): 633–43. doi:10.1007/s00401-014-1266-2.
- Maslah, E, M Mallory, L Hansen, M Alford, T Albright, R Terry, P Shapiro, M Sundsmo, and T Saitoh. 1991. “Immunoreactivity of CD45, a Protein Phosphotyrosine Phosphatase, in Alzheimer’s Disease.” *Acta Neuropathologica* 83 (1): 12–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1838850>.
- Mast, Natalia, Wei-Li Liao, Irina A Pikuleva, and Illarion V Turko. 2009. “Combined Use of Mass Spectrometry and Heterologous Expression for Identification of Membrane-Interacting Peptides in Cytochrome P450 46A1 and NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483 (1): 81–89. doi:10.1016/j.abb.2009.01.002.
- Matsumura, Nobutaka, Mako Takami, Masayasu Okochi, Satoko Wada-Kakuda, Hitomi Fujiwara, Shinji Tagami, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara, and Maho Morishima-Kawashima. 2014. “??-Secretase Associated with Lipid Rafts: Multiple Interactive Pathways in the Stepwise Processing Of??-Carboxylterminal Fragment.” *Journal of Biological Chemistry* 289 (8): 5109–21. doi:10.1074/jbc.M113.510131.
- Mattsson, Niklas, Henrik Zetterberg, Oskar Hansson, Niels Andreasen, Lucilla Parnetti, Michael Jonsson, Sanna-Kaisa Herukka, et al. 2009. “CSF Biomarkers and Incipient Alzheimer Disease in Patients with Mild Cognitive Impairment.” *JAMA* 302 (4): 385–93. doi:10.1001/jama.2009.1064.
- Mauch, D. H. 2001. “CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol.” *Science* 294 (5545): 1354–57. doi:10.1126/science.294.5545.1354.
- McLaurin, J, and A Chakrabarty. 1996. “Membrane Disruption by Alzheimer Beta-Amyloid Peptides Mediated through Specific Binding to Either Phospholipids or Gangliosides. Implications for Neurotoxicity.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (43): 26482–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900116>.

- Meaney, Steve, Karl Bodin, Ulf Diczfalusy, and Ingemar Björkhem. 2002. "On the Rate of Translocation in Vitro and Kinetics in Vivo of the Major Oxysterols in Human Circulation: Critical Importance of the Position of the Oxygen Function." *Journal of Lipid Research* 43 (26): 2130–35. doi:10.1194/jlr.M200293-JLR200.
- Michikawa, M, Q W Fan, I Isobe, and K Yanagisawa. 2000. "Apolipoprotein E Exhibits Isoform-Specific Promotion of Lipid Efflux from Astrocytes and Neurons in Culture." *Journal of Neurochemistry* 74 (3): 1008–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10693931>.
- Miller, Christopher C J, Declan M McLoughlin, Kwok-Fai Lau, Maria E Tennant, and Boris Rogelj. 2006. "The X11 Proteins, Abeta Production and Alzheimer's Disease." *Trends in Neurosciences* 29 (5): 280–85. doi:10.1016/j.tins.2006.03.001.
- Milosch, N, G Tanriöver, a Kundu, a Rami, J-C François, F Baumkötter, S W Weyer, et al. 2014. "Holo-APP and G-Protein-Mediated Signaling Are Required for sAPP α -Induced Activation of the Akt Survival Pathway." *Cell Death & Disease* 5: e1391. doi:10.1038/cddis.2014.352.
- Minagawa, Hirohisa, Jiang-Sheng Gong, Cha-Gyun Jung, Atsushi Watanabe, Sissel Lund-Katz, Michael C Phillips, Hiroyuki Saito, and Makoto Michikawa. 2009. "Mechanism Underlying Apolipoprotein E (ApoE) Isoform-Dependent Lipid Efflux from Neural Cells in Culture." *Journal of Neuroscience Research* 87 (11): 2498–2508. doi:10.1002/jnr.22073.
- Miravalle, L, T Tokuda, R Chiarle, G Giaccone, O Bugiani, F Tagliavini, B Frangione, and J Ghiso. 2000. "Substitutions at Codon 22 of Alzheimer's Abeta Peptide Induce Diverse Conformational Changes and Apoptotic Effects in Human Cerebral Endothelial Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 27110–16. doi:10.1074/jbc.M003154200.
- Möckel, B, H Zinke, R Flach, B Weiss, H Weiler-Güttler, and H G Gassen. 1994. "Expression of Apolipoprotein A-I in Porcine Brain Endothelium in Vitro." *Journal of Neurochemistry* 62 (2): 788–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294940>.
- Moffat, S D, C A Szekely, A B Zonderman, N J Kabani, and S M Resnick. 2000. "Longitudinal Change in Hippocampal Volume as a Function of Apolipoprotein E Genotype." *Neurology* 55 (1): 134–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891924>.
- Mori, T, D Paris, T Town, a M Rojiani, D L Sparks, a Delledonne, F Crawford, et al. 2001. "Cholesterol Accumulates in Senile Plaques of Alzheimer Disease Patients and in Transgenic APP(SW) Mice." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60 (8): 778–85.
- Morra, Jonathan H, Zhuowen Tu, Liana G Apostolova, Amity E Green, Christina Avedissian, Sarah K Madsen, Neelroop Parikshak, et al. 2008. "Validation of a Fully Automated 3D Hippocampal Segmentation Method Using Subjects with Alzheimer's Disease Mild Cognitive Impairment, and Elderly Controls." *NeuroImage* 43 (1): 59–68. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.07.003.
- . 2009. "Automated Mapping of Hippocampal Atrophy in 1-Year Repeat MRI Data from 490 Subjects with Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, and Elderly Controls." *NeuroImage* 45 (1 Suppl): S3-15. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.10.043.

- Morris, J C, M Storandt, J P Miller, D W McKeel, J L Price, E H Rubin, and L Berg. 2001. "Mild Cognitive Impairment Represents Early-Stage Alzheimer Disease." *Archives of Neurology* 58 (3): 397–405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11255443>.
- Mosconi, L, D Perani, S Sorbi, K Herholz, B Nacmias, V Holthoff, E Salmon, et al. 2004. "MCI Conversion to Dementia and the APOE Genotype: A Prediction Study with FDG-PET." *Neurology* 63 (12): 2332–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623696>.
- Mulder, Sandra D., Henrietta M. Nielsen, Marinus A. Blankenstein, Piet Eikelenboom, and Robert Veerhuis. 2014. "Apolipoproteins E and J Interfere with Amyloid-Beta Uptake by Primary Human Astrocytes and Microglia in Vitro." *Glia* 62 (4): 493–503. doi:10.1002/glia.22619.
- Mullan, M, F Crawford, K Axelman, H Houlden, L Lilius, B Winblad, and L Lannfelt. 1992. "A Pathogenic Mutation for Probable Alzheimer's Disease in the APP Gene at the N-Terminus of Beta-Amyloid." *Nature Genetics* 1 (5): 345–47. doi:10.1038/ng0892-345.
- Multhaup, Gerd. 2006. "Amyloid Precursor Protein and BACE Function as Oligomers." *Neuro-Degenerative Diseases* 3 (4–5): 270–74. doi:10.1159/000095266.
- Munter, Lisa-Marie, Philipp Voigt, Anja Harmeier, Daniela Kaden, Kay E Gottschalk, Christoph Weise, Rüdiger Pipkorn, Michael Schaefer, Dieter Langosch, and Gerd Multhaup. 2007. "GxxxG Motifs within the Amyloid Precursor Protein Transmembrane Sequence Are Critical for the Etiology of Aβ42." *The EMBO Journal* 26 (6): 1702–12. doi:10.1038/sj.emboj.7601616.
- Mutka, Aino-Liisa, Sari Lusa, Matts D Linder, Eija Jokitalo, Outi Kopra, Matti Jauhiainen, and Elina Ikonen. 2004. "Secretion of Sterols and the NPC2 Protein from Primary Astrocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 48654–62. doi:10.1074/jbc.M405345200.
- Nadezhdin, Kirill D, Olga V Bocharova, Eduard V Bocharov, and Alexander S Arseniev. 2012. "Dimeric Structure of Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein in Micellar Environment." *FEBS Letters* 586 (12): 1687–92. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.062.
- Naiki, H, F Gejyo, and K Nakakuki. 1997. "Concentration-Dependent Inhibitory Effects of Apolipoprotein E on Alzheimer's Beta-Amyloid Fibril Formation in Vitro." *Biochemistry* 36 (20): 6243–50. doi:10.1021/bi9624705.
- Naj, Adam C, Gyungah Jun, Gary W Beecham, Li-San Wang, Badri Narayan Vardarajan, Jacqueline Buros, Paul J Gallins, et al. 2011. "Common Variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 Are Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease." *Nature Genetics* 43 (5): 436–41. doi:10.1038/ng.801.
- Nakamura, Kotoka, Matthew A Kennedy, Angel Baldán, Dragana D Bojanic, Karen Lyons, and Peter A Edwards. 2004. "Expression and Regulation of Multiple Murine ATP-Binding Cassette Transporter G1 mRNAs/isoforms That Stimulate Cellular Cholesterol Efflux to High Density Lipoprotein." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (44): 45980–89. doi:10.1074/jbc.M408652200.
- Nicolas, Maya, and Bassem A Hassan. 2014. "Amyloid Precursor Protein and Neural Development." *Development (Cambridge, England)* 141 (13): 2543–48.

doi:10.1242/dev.108712.

- Nielsen, Henrietta M., Sandra D. Mulder, J. A M Beliën, R. J P Musters, Piet Eikelenboom, and Robert Veerhuis. 2010. "Astrocytic A β 1-42 Uptake Is Determined by A β -Aggregation State and the Presence of Amyloid-Associated Proteins." *Glia* 58 (10): 1235–46. doi:10.1002/glia.21004.
- Nieweg, Katja, Hubert Schaller, and Frank W Pfrieder. 2009. "Marked Differences in Cholesterol Synthesis between Neurons and Glial Cells from Postnatal Rats." *Journal of Neurochemistry* 109 (1): 125–34. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x.
- Nilsberth, C, a Westlind-Danielsson, C B Eckman, M M Condrón, K Axelman, C Forsell, C Stenh, et al. 2001a. "The 'Arctic' APP Mutation (E693G) Causes Alzheimer's Disease by Enhanced Abeta Protofibril Formation." *Nature Neuroscience* 4 (9): 887–93. doi:10.1038/nn0901-887.
- Nilsberth, C, A Westlind-Danielsson, C B Eckman, M M Condrón, K Axelman, C Forsell, C Stenh, et al. 2001b. "The 'Arctic' APP Mutation (E693G) Causes Alzheimer's Disease by Enhanced Abeta Protofibril Formation." *Nature Neuroscience* 4 (9): 887–93. doi:10.1038/nn0901-887.
- Nishitsuji, Kazuchika, Takami Tomiyama, Kenichi Ishibashi, Kazuhiro Ito, Rie Teraoka, Mary P Lambert, William L Klein, and Hiroshi Mori. 2009. "The E693Delta Mutation in Amyloid Precursor Protein Increases Intracellular Accumulation of Amyloid Beta Oligomers and Causes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Cultured Cells." *The American Journal of Pathology* 174 (3): 957–69. doi:10.2353/ajpath.2009.080480.
- Nordberg, Agneta, Stephen F. Carter, Juha Rinne, Alexander Drzezga, David J. Brooks, Rik Vandenberghe, Daniela Perani, et al. 2013. "A European Multicentre PET Study of Fibrillar Amyloid in Alzheimer's Disease." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 40 (1): 104–14. doi:10.1007/s00259-012-2237-2.
- Oitzl, M S, M Mulder, P J Lucassen, L M Havekes, J Grootendorst, and E R de Kloet. 1997. "Severe Learning Deficits in Apolipoprotein E-Knockout Mice in a Water Maze Task." *Brain Research* 752 (1–2): 189–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9106456>.
- Oldfield, Susan, Christopher Lowry, Jon Ruddick, and Stafford Lightman. 2002. "ABCG4: A Novel Human White Family ABC-Transporter Expressed in the Brain and Eye." *Biochimica et Biophysica Acta* 1591 (1–3): 175–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183068>.
- Osenkowski, Pamela, Wenjuan Ye, Rong Wang, Michael S. Wolfe, and Dennis J. Selkoe. 2008. "Direct and Potent Regulation of ??-Secretase by Its Lipid Microenvironment." *Journal of Biological Chemistry* 283 (33): 22529–40. doi:10.1074/jbc.M801925200.
- Ostrowski, Stephen M., Brandy L. Wilkinson, Todd E. Golde, and Gary Landreth. 2007. "Statins Reduce Amyloid-?? Production through Inhibition of Protein Isoprenylation." *Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 26832–44. doi:10.1074/jbc.M702640200.
- Ott, B R, C A Tate, N M Gordon, and W C Heindel. 1996. "Gender Differences in the Behavioral Manifestations of Alzheimer's Disease." *Journal of the American Geriatrics Society* 44 (5): 583–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617910>.

- Page, Richard M., Amelie Gutschiedl, Akio Fukumori, Edith Winkler, Christian Haass, and Harald Steiner. 2010. “ β -Amyloid Precursor Protein Mutants Respond to β -Secretase Modulators.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (23): 17798–810. doi:10.1074/jbc.M110.103283.
- Panchal, Mai, Jacqueline Loeper, Jack-Christophe Cossec, Claire Perruchini, Adina Lazar, Denis Pompon, and Charles Duyckaerts. 2010. “Enrichment of Cholesterol in Microdissected Alzheimer’s Disease Senile Plaques as Assessed by Mass Spectrometry.” *Journal of Lipid Research* 51 (3): 598–605. doi:10.1194/jlr.M001859.
- Panegyres, Peter K, John B J Kwok, Peter R Schofield, and Peter C Blumbergs. 2005. “A Western Australian Kindred with Dutch Cerebral Amyloid Angiopathy.” *Journal of the Neurological Sciences* 239 (1): 75–80. doi:10.1016/j.jns.2005.08.002.
- Papadopoulos, Panayiota, Xin Kang Tong, and Edith Hamel. 2014. “Selective Benefits of Simvastatin in Bitransgenic APPSwe,Ind/TGF- β 1 Mice.” *Neurobiology of Aging* 35 (1): 203–12. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.010.
- Papassotiropoulos, A, D Lütjohann, M Bagli, S Locatelli, F Jessen, R Buschfort, U Ptak, I Björkhem, K von Bergmann, and R Heun. 2002. “24S-Hydroxycholesterol in Cerebrospinal Fluid Is Elevated in Early Stages of Dementia.” *Journal of Psychiatric Research* 36 (1): 27–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11755458>.
- Papassotiropoulos, A, D Lütjohann, M Bagli, S Locatelli, F Jessen, M L Rao, W Maier, I Björkhem, K von Bergmann, and R Heun. 2000. “Plasma 24S-Hydroxycholesterol: A Peripheral Indicator of Neuronal Degeneration and Potential State Marker for Alzheimer’s Disease.” *Neuroreport* 11 (9): 1959–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884051>.
- Papassotiropoulos, Et Al. 2003. “Increased Brain β -Amyloid Load, Phosphorylated Tau, and Risk of Alzheimer Disease Associated With an Intronic.” *The Journal of the American Medical Association - JAMA* 60.
- Pape, M E, P A Schultz, T J Rea, R B DeMattos, K Kieft, C L Bisgaier, R S Newton, and B R Krause. 1995. “Tissue Specific Changes in Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase (ACAT) mRNA Levels in Rabbits.” *Journal of Lipid Research* 36 (4): 823–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7616126>.
- Pasinetti, G M, S A Johnson, T Oda, I Rozovsky, and C E Finch. 1994. “Clusterin (SGP-2): A Multifunctional Glycoprotein with Regional Expression in Astrocytes and Neurons of the Adult Rat Brain.” *The Journal of Comparative Neurology* 339 (3): 387–400. doi:10.1002/cne.903390307.
- Patterson, Kristina R, Christine Remmers, Yifan Fu, Sarah Brooker, Nicholas M Kanaan, Laurel Vana, Sarah Ward, et al. 2011. “Characterization of Prefibrillar Tau Oligomers in Vitro and in Alzheimer Disease.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (26): 23063–76. doi:10.1074/jbc.M111.237974.
- Peacock, M L, J T Warren, A D Roses, and J K Fink. 1993. “Novel Polymorphism in the A4 Region of the Amyloid Precursor Protein Gene in a Patient without Alzheimer’s Disease.” *Neurology* 43 (6): 1254–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8170579>.
- Perez, R G, S Soriano, J D Hayes, B Ostaszewski, W Xia, D J Selkoe, X Chen, G B Stokin,

- and E H Koo. 1999. "Mutagenesis Identifies New Signals for Beta-Amyloid Precursor Protein Endocytosis, Turnover, and the Generation of Secreted Fragments, Including Abeta42." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (27): 18851–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383380>.
- Pernber, Z, K Blennow, N Bogdanovic, J-E Månsson, and M Blomqvist. 2012. "Altered Distribution of the Gangliosides GM1 and GM2 in Alzheimer's Disease." *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 33 (2–3): 174–88. doi:10.1159/000338181.
- Petrovitch, H, L R White, G Izmirilian, G W Ross, R J Havlik, W Markesbery, J Nelson, et al. 2000. "Midlife Blood Pressure and Neuritic Plaques, Neurofibrillary Tangles, and Brain Weight at Death: The HAAS. Honolulu-Asia Aging Study." *Neurobiology of Aging* 21 (1): 57–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794849>.
- Pfriefer, Frank W., and Nicole Ungerer. 2011. "Cholesterol Metabolism in Neurons and Astrocytes." *Progress in Lipid Research* 50 (4). Elsevier Ltd: 357–71. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.002.
- Piermartiri, Tetsadê C B, Cláudia P. Figueiredo, Daniel Rial, Filipe S. Duarte, Sarah C. Bezerra, Gianni Mancini, Andreza F. de Bem, Rui D S Prediger, and Carla I. Tasca. 2010. "Atorvastatin Prevents Hippocampal Cell Death, Neuroinflammation and Oxidative Stress Following Amyloid-??1-40 Administration in Mice: Evidence for Dissociation between Cognitive Deficits and Neuronal Damage." *Experimental Neurology* 226 (2): 274–84. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.030.
- Pierrot, Nathalie, Donatienne Tyteca, Ludovic D'auria, Ilse Dewachter, Philippe Gailly, Aurélie Hendrickx, Bernadette Tasiaux, et al. 2013. "Amyloid Precursor Protein Controls Cholesterol Turnover Needed for Neuronal Activity." *EMBO Molecular Medicine* 5 (4): 608–25. doi:10.1002/emmm.201202215.
- Plassman, B. L., K. M. Langa, G. G. Fisher, S. G. Heeringa, D. R. Weir, M. B. Ofstedal, J. R. Burke, et al. 2007. "Prevalence of Dementia in the United States: The Aging, Demographics, and Memory Study." *Neuroepidemiology* 29 (1–2): 125–32. doi:10.1159/000109998.
- Popp, Julius, Piotr Lewczuk, Heike Kölsch, Sabrina Meichsner, Wolfgang Maier, Johannes Kornhuber, Frank Jessen, and Dieter Lütjohann. 2012. "Cholesterol Metabolism Is Associated with Soluble Amyloid Precursor Protein Production in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 123 (2): 310–16. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07893.x.
- Popp, Julius, Sabrina Meichsner, Heike Kölsch, Piotr Lewczuk, Wolfgang Maier, Johannes Kornhuber, Frank Jessen, and Dieter Lütjohann. 2013. "Cerebral and Extracerebral Cholesterol Metabolism and CSF Markers of Alzheimer's Disease." *Biochemical Pharmacology* 86 (1): 37–42. doi:10.1016/j.bcp.2012.12.007.
- Prasad, Rajendra, Nitesh Kumar Khandelwal, and Atanu Banerjee. 2016. "Yeast ABC Transporters in Lipid Trafficking." *Fungal Genetics and Biology* 93. Elsevier Inc.: 25–34. doi:10.1016/j.fgb.2016.05.008.
- Price, Ashleigh R, Guilian Xu, Zoe B Siemienski, Lisa A Smithson, David R Borchelt, Todd E Golde, and Kevin M Felsenstein. 2013. "Comment on 'ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models'." *Science (New York, N.Y.)* 340 (6135): 924–d. doi:10.1126/science.1234089.

- Prince, M, R Bryce, E Albanese, A Wimo, W Ribeiro, and C P Ferri. 2013. "The Global Prevalence of Dementia: A Systematic Review and Metaanalysis." *Alzheimers Dement* 9 (1): 63–75 e2. doi:10.1016/j.jalz.2012.11.007.
- Qi, Yue, Maho Morishima-Kawashima, Toru Sato, Rie Mitsumori, and Yasuo Ihara. 2003. "Distinct Mechanisms by Mutant Presenilin 1 and 2 Leading to Increased Intracellular Levels of Amyloid ??-Protein 42 in Chinese Hamster Ovary Cells." *Biochemistry* 42 (4): 1042–52. doi:10.1021/bi0267590.
- Refolo, L M, B Malester, J LaFrancois, T Bryant-Thomas, R Wang, G S Tint, K Sambamurti, K Duff, and M a Pappolla. 2000. "Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model." *Neurobiology of Disease* 7 (4): 321–31. doi:10.1006/nbdi.2000.0304.
- Ren, Zhao, Dale Schenk, Guriqbal S. Basi, and I. Paul Shapiro. 2007. "Amyloid ??-Protein Precursor Juxtamembrane Domain Regulates Specificity of ??-Secretase-Dependent Cleavages." *Journal of Biological Chemistry* 282 (48): 35350–60. doi:10.1074/jbc.M702739200.
- Riddell, D R., G Christie, I Hussain, and C Dingwall. 2001. "Compartmentalization of Beta-Secretase (Asp2) into Low-Buoyant Density, Noncaveolar Lipid Rafts." *Current Biology : CB* 11 (16): 1288–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525745>.
- Riddell, David R., Gary Christie, Ishrut Hussain, and Colin Dingwall. 2001. "Compartmentalization of ??-Secretase (Asp2) into Low-Buoyant Density, Noncaveolar Lipid Rafts." *Current Biology* 11 (16): 1288–93. doi:10.1016/S0960-9822(01)00394-3.
- Roberson, Erik D, Kimberly Scearce-Levie, Jorge J Palop, Fengrong Yan, Irene H Cheng, Tiffany Wu, Hilary Gerstein, Gui-Qiu Yu, and Lennart Mucke. 2007. "Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid Beta-Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Science (New York, N.Y.)* 316 (5825): 750–54. doi:10.1126/science.1141736.
- Rodrigue, K M, K M Kennedy, M D Devous, J R Rieck, A C Hebrank, R Diaz-Arrastia, D Mathews, and D C Park. 2012. "β-Amyloid Burden in Healthy Aging: Regional Distribution and Cognitive Consequences." *Neurology* 78 (6): 387–95. doi:10.1212/WNL.0b013e318245d295.
- Rogaev, E I, R Sherrington, E A Rogaeva, G Levesque, M Ikeda, Y Liang, H Chi, C Lin, K Holman, and T Tsuda. 1995. "Familial Alzheimer's Disease in Kindreds with Missense Mutations in a Gene on Chromosome 1 Related to the Alzheimer's Disease Type 3 Gene." *Nature* 376 (6543): 775–78. doi:10.1038/376775a0.
- Rogers, J, J Lubner-Narod, S D Styren, and W H Civin. 1988. "Expression of Immune System-Associated Antigens by Cells of the Human Central Nervous System: Relationship to the Pathology of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 9 (4): 339–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3263583>.
- Romas, S N, M X Tang, L Berglund, and R Mayeux. 1999. "APOE Genotype, Plasma Lipids, Lipoproteins, and AD in Community Elderly." *Neurology* 53 (3): 517–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449113>.
- Rowe, Christopher C., Kathryn A. Ellis, Miroslava Rimajova, Pierrick Bourgeat, Kerryn E.

- Pike, Gareth Jones, Jurgen Fripp, et al. 2010. "Amyloid Imaging Results from the Australian Imaging, Biomarkers and Lifestyle (AIBL) Study of Aging." *Neurobiology of Aging* 31 (8): 1275–83. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.007.
- Ryan, Kathleen A., and Sanjay W. Pimplikar. 2005. "Activation of GSK-3 and Phosphorylation of CRMP2 in Transgenic Mice Expressing APP Intracellular Domain." *Journal of Cell Biology* 171 (2): 327–35. doi:10.1083/jcb.200505078.
- Sadowski, Martin J, Joanna Pankiewicz, Henrieta Scholtzova, Pankaj D Mehta, Frances Prelli, David Quartermain, and Thomas Wisniewski. 2006. "Blocking the Apolipoprotein E/amyloid-Beta Interaction as a Potential Therapeutic Approach for Alzheimer's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (49): 18787–92. doi:10.1073/pnas.0604011103.
- Saher, Gesine, Britta Brügger, Corinna Lappe-Siefke, Wiebke Möbius, Ryu-ichi Tozawa, Michael C Wehr, Felix Wieland, Shun Ishibashi, and Klaus-Armin Nave. 2005. "High Cholesterol Level Is Essential for Myelin Membrane Growth." *Nature Neuroscience* 8 (4): 468–75. doi:10.1038/nn1426.
- Saito, Hiroyuki, Padmaja Dhanasekaran, David Nguyen, Faye Baldwin, Karl H Weisgraber, Suzanne Wehrl, Michael C Phillips, and Sissel Lund-Katz. 2003. "Characterization of the Heparin Binding Sites in Human Apolipoprotein E." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (17): 14782–87. doi:10.1074/jbc.M213207200.
- Saito, M, E P Benson, M Saito, and A Rosenberg. 1987. "Metabolism of Cholesterol and Triacylglycerol in Cultured Chick Neuronal Cells, Glial Cells, and Fibroblasts: Accumulation of Esterified Cholesterol in Serum-Free Culture." *Journal of Neuroscience Research* 18 (2): 319–25. doi:10.1002/jnr.490180208.
- Sakurai, Takashi, Kumi Kaneko, Misako Okuno, Koji Wada, Taku Kashiyama, Hideaki Shimizu, Takumi Akag, Tsutomu Hashikawa, and Nobuyuki Nukina. 2008. "Membrane Microdomain Switching: A Regulatory Mechanism of Amyloid Precursor Protein Processing." *Journal of Cell Biology* 183 (2): 339–52. doi:10.1083/jcb.200804075.
- Salloway, Stephen, and Stephen Correia. 2009. "Alzheimer Disease: Time to Improve Its Diagnosis and Treatment." *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 76 (1): 49–58. doi:10.3949/ccjm.76a.072178.
- Sato, Takeshi, Tzu-Chun Tang, Gabriella Reubins, Jeffrey Z Fei, Taiki Fujimoto, Pascal Kienlen-Campard, Stefan N Constantinescu, Jean-Noel Octave, Saburo Aimoto, and Steven O Smith. 2009. "A Helix-to-Coil Transition at the Epsilon-Cut Site in the Transmembrane Dimer of the Amyloid Precursor Protein Is Required for Proteolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (5): 1421–26. doi:10.1073/pnas.0812261106.
- Sato, Toru, Thekla S Diehl, Saravanakumar Narayanan, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara, Bart De Strooper, Harald Steiner, Christian Haass, and Michael S Wolfe. 2007. "Active Gamma-Secretase Complexes Contain Only One of Each Component." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (47): 33985–93. doi:10.1074/jbc.M705248200.
- Sato, Yoshiaki, Francois Bernier, Yasukazu Yamanaka, Ken Aoshima, Yoshiya Oda, Martin Ingelsson, Lars Lannfelt, Akinori Miyashita, Ryoza Kuwano, and Takeshi Ikeuchi. 2015. "Reduced Plasma Desmosterol-to-Cholesterol Ratio and Longitudinal Cognitive Decline

- in Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring* 1: 67–74. doi:10.1016/j.dadm.2014.11.009.
- Saunders, a., W.J. Strittmatter, D Schmechel, Peter H. St. George-Hyslop, Margaret a. Pericak-Vance, S H Joo, B L Rosi, et al. 1993. "Association of Apolipoprotein E Allele ϵ 4 with Late Onset Familial and Sporadic Alzheimer's Disease." *Neurology* 43 (8): 1467. doi:10.1212/WNL.43.8.1467.
- Scala, Coralie Di, Henri Chahinian, Nouara Yahi, Nicolas Garmy, and Jacques Fantini. 2014. "Interaction of Alzheimer's β - Amyloid Peptides with Cholesterol: Mechanistic Insights into Amyloid Pore Formation."
- Scheltens, Philip, Kaj Blennow, Monique M B Breteler, Bart De Strooper, Giovanni B Frisoni, Stephen Salloway, and Wiesje Maria Van Der Flier. 2016. "Seminar Alzheimer's Disease" 6736 (15): 1–13.
- Scheuner, D, C Eckman, M Jensen, X Song, M Citron, N Suzuki, T D Bird, et al. 1996. "Secreted Amyloid Beta-Protein Similar to That in the Senile Plaques of Alzheimer's Disease Is Increased in Vivo by the Presenilin 1 and 2 and APP Mutations Linked to Familial Alzheimer's Disease." *Nature Medicine* 2 (8): 864–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8705854>.
- Schmechel, D E, A M Saunders, W J Strittmatter, B J Crain, C M Hulette, S H Joo, M A Pericak-Vance, D Goldgaber, and A D Roses. 1993. "Increased Amyloid Beta-Peptide Deposition in Cerebral Cortex as a Consequence of Apolipoprotein E Genotype in Late-Onset Alzheimer Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (20): 9649–53. doi:10.1073/pnas.90.20.9649.
- Schmitz, G, W E Kaminski, and E Orsó. 2000. "ABC Transporters in Cellular Lipid Trafficking." *Current Opinion in Lipidology* 11 (5): 493–501. doi:10.1097/00041433-200010000-00007.
- Schneider, A., L. Rajendran, M. Honsho, M. Gralle, G. Donnert, F. Wouters, S. W. Hell, and M. Simons. 2008. "Flotillin-Dependent Clustering of the Amyloid Precursor Protein Regulates Its Endocytosis and Amyloidogenic Processing in Neurons." *Journal of Neuroscience* 28 (11): 2874–82. doi:10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008.
- Schneider, Wolfgang J, Petri T Kovanen, Michael S Brown, Joseph L Goldstein, Gerd Utermann, Wilfried Weber, Richard J Havel, et al. 1981. "Familial Dysbetalipoproteinemia." *Journal of Clinical Epidemiology* 68 (November): 1075–85.
- Schreurs, B G, C A Smith-Bell, and S K Lemieux. 2013. "Dietary Cholesterol Increases Ventricular Volume and Narrows Cerebrovascular Diameter in a Rabbit Model of Alzheimer's Disease." *Neuroscience* 254 (December): 61–69. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.015.
- Schuff, N., N. Woerner, L. Boreta, T. Kornfield, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski, P. M. Thompson, C. R. Jack, and M. W. Weiner. 2009. "MRI of Hippocampal Volume Loss in Early Alzheimers Disease in Relation to ApoE Genotype and Biomarkers." *Brain* 132 (4): 1067–77. doi:10.1093/brain/awp007.
- Selkoe, Dennis J, and John Hardy. 2016. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years." *EMBO Molecular Medicine* 8 (6): 1–14. doi:10.15252/emmm.201606210.

- Sergeant, Nicolas, Alexis Bretteville, Malika Hamdane, Marie-Laure Caillet-Boudin, Pierre Grognon, Stephanie Bombois, David Blum, et al. 2008. "Biochemistry of Tau in Alzheimer's Disease and Related Neurological Disorders." *Expert Review of Proteomics* 5 (2): 207–24. doi:10.1586/14789450.5.2.207.
- Sérougne-Gautheron, C, and F Chevallier. 1973. "Time Course of Biosynthetic Cholesterol in the Adult Rat Brain." *Biochimica et Biophysica Acta* 316 (2): 244–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4741912>.
- Serrano-Pozo, Alberto, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, and Bradley T. Hyman. 2011. "Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1): 1–24. doi:10.1101/cshperspect.a006189.
- Seshadri, S, P A Wolf, A Beiser, R Au, K McNulty, R White, and R B D'Agostino. 1997. "Lifetime Risk of Dementia and Alzheimer's Disease. The Impact of Mortality on Risk Estimates in the Framingham Study." *Neurology* 49 (6): 1498–1504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409336>.
- Seubert, P, T Oltersdorf, M G Lee, R Barbour, C Blomquist, D L Davis, K Bryant, L C Fritz, D Galasko, and L J Thal. 1993. "Secretion of Beta-Amyloid Precursor Protein Cleaved at the Amino Terminus of the Beta-Amyloid Peptide." *Nature* 361 (6409): 260–63. doi:10.1038/361260a0.
- Shafaati, Marjan, Amelia Marutle, Hanna Pettersson, Anita Lövgren-Sandblom, Maria Olin, Irina Pikuleva, Bengt Winblad, Agneta Nordberg, and Ingemar Björkhem. 2011. "Marked Accumulation of 27-Hydroxycholesterol in the Brains of Alzheimer's Patients with the Swedish APP 670/671 Mutation." *Journal of Lipid Research* 52 (5): 1004–10. doi:10.1194/jlr.M014548.
- Shaw, Leslie M, Hugo Vanderstichele, Malgorzata Knapik-Czajka, Christopher M Clark, Paul S Aisen, Ronald C Petersen, Kaj Blennow, et al. 2009. "Cerebrospinal Fluid Biomarker Signature in Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative Subjects." *Annals of Neurology* 65 (4): 403–13. doi:10.1002/ana.21610.
- Shinohara, Mitsuru, Naoyuki Sato, Hitomi Kurinami, Daisuke Takeuchi, Shuko Takeda, Munehisa Shimamura, Toshihide Yamashita, Yasuo Uchiyama, Hiromi Rakugi, and Ryuichi Morishita. 2010. "Reduction of Brain ??-Amyloid (A??) By Fluvastatin, a Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Inhibitor, through Increase in Degradation of Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragments (APP-CTFs) and A?? Clearance." *Journal of Biological Chemistry* 285 (29): 22091–102. doi:10.1074/jbc.M110.102277.
- Shobab, Leila A, Ging-yuek R Hsiung, and Howard H Feldman. 2005. "Cholesterol in Alzheimer ' S Disease" 4 (December).
- Simons, Kai, and Mathias J Gerl. 2010. "Revitalizing Membrane Rafts: New Tools and Insights." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (10): 688–99. doi:10.1038/nrm2977.
- Simons, K, and D Toomre. 2000. "Lipid Rafts and Signal Transduction." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 31–39. doi:10.1038/35036052.
- Simons, M, P Keller, B De Strooper, K Beyreuther, C G Dotti, and K Simons. 1998. "Cholesterol Depletion Inhibits the Generation of Beta-Amyloid in Hippocampal

- Neurons.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6460–64. doi:10.1073/pnas.95.11.6460.
- Sinha, S, J P Anderson, R Barbour, G S Basl, R Caccavello, D Davis, M Doan, et al. 1999. “Purification and Cloning of Amyloid Precursor Protein Beta-Secretase from Human Brain.” *Nature* 402 (6761): 537–40. doi:10.1038/990114.
- Sisodia, S.S., E.H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck, and D.L. Price. 1990. “Evidence That β -Amyloid Protein in Alzheimer’s Disease Is Not Derived by Normal Processing.” *Science* 248 (4954): 492–95. doi:10.1126/science.1691865.
- Smiljanic, Kosara, Tim Vanmierlo, and Aleksandra Mladenovic. 2013. “Aging Induces Tissue-Specific Changes in Cholesterol Metabolism in Rat Brain and Liver,” 1069–77. doi:10.1007/s11745-013-3836-9.
- Smith, K M, R M Lawn, and J N Wilcox. 1990. “Cellular Localization of Apolipoprotein D and Lecithin:cholesterol Acyltransferase mRNA in Rhesus Monkey Tissues by in Situ Hybridization.” *Journal of Lipid Research* 31 (6): 995–1004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373967>.
- Snipes, G J, C B McGuire, J J Norden, and J a Freeman. 1986. “Nerve Injury Stimulates the Secretion of Apolipoprotein E by Nonneuronal Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (4): 1130–34. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- So, Pauline Pl, Christina E Khodr, Ci-Di Chen, and Carmela R Abraham. 2013. “Comparable Dimerization Found in Wildtype and Familial Alzheimer’s Disease Amyloid Precursor Protein Mutants.” *Am J Neurodegener Dis* 2 (1): 15–28.
- Sodhi, Rupinder K, and Nirmal Singh. 2014. “Liver X Receptor Agonist T0901317 Reduces Neuropathological Changes and Improves Memory in Mouse Models of Experimental Dementia.” *European Journal of Pharmacology* 732 (June): 50–59. doi:10.1016/j.ejphar.2014.03.025.
- Solomon, Alina, Miia Kivipelto, Benjamin Wolozin, Jufen Zhou, and Rachel A. Whitmer. 2009. “Midlife Serum Cholesterol and Increased Risk of Alzheimer’s and Vascular Dementia Three Decades Later.” *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 28 (1): 75–80. doi:10.1159/000231980.
- Solomon, Alina, Valerio Leoni, Miia Kivipelto, Ariadna Besga, Anne Rita Öksengård, Per Julin, Leif Svensson, et al. 2009. “Plasma Levels of 24S-Hydroxycholesterol Reflect Brain Volumes in Patients without Objective Cognitive Impairment but Not in Those with Alzheimer’s Disease.” *Neuroscience Letters* 462 (1): 89–93. doi:10.1016/j.neulet.2009.06.073.
- Sontag, E, V Nunbhakdi-Craig, G Lee, G S Bloom, and M C Mumby. 1996. “Regulation of the Phosphorylation State and Microtubule-Binding Activity of Tau by Protein Phosphatase 2A.” *Neuron* 17 (6): 1201–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982166>.
- Sparks, D L, S W Scheff, J C Hunsaker, H Liu, T Landers, and D R Gross. 1994. “Induction of Alzheimer-like Beta-Amyloid Immunoreactivity in the Brains of Rabbits with Dietary

- Cholesterol.” *Experimental Neurology* 126 (1): 88–94. doi:10.1006/exnr.1994.1044.
- Sperling, Reisa A, Paul S Aisen, Laurel A Beckett, David A Bennett, Suzanne Craft, Anne M Fagan, Takeshi Iwatsubo, et al. 2011. “Toward Defining the Preclinical Stages of Alzheimer’s Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer’s Disease.” *Alzheimer’s & Dementia : The Journal of the Alzheimer’s Association* 7 (3): 280–92. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.003.
- Stephen Deci, Susan K. Lemieux. 2012. “NIH Public Access.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 100 (2): 130–34. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.
- Strozyk, D, K Blennow, L R White, and L J Launer. 2003. “CSF Abeta 42 Levels Correlate with Amyloid-Neuropathology in a Population-Based Autopsy Study.” *Neurology* 60 (4): 652–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601108>.
- Su, P, H Rennert, R M Shayiq, R Yamamoto, Y M Zheng, S Addya, J F Strauss, and N G Avadhani. 1990. “A cDNA Encoding a Rat Mitochondrial Cytochrome P450 Catalyzing Both the 26-Hydroxylation of Cholesterol and 25-Hydroxylation of Vitamin D3: Gonadotropic Regulation of the Cognate mRNA in Ovaries.” *DNA and Cell Biology* 9 (9): 657–67. doi:10.1089/dna.1990.9.657.
- Suzuki, N, T T Cheung, X D Cai, A Odaka, L Otvos, C Eckman, T E Golde, and S G Younkin. 1994. “An Increased Percentage of Long Amyloid Beta Protein Secreted by Familial Amyloid Beta Protein Precursor (Beta APP717) Mutants.” *Science (New York, N.Y.)* 264 (5163): 1336–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8191290>.
- Swan, G E, C DeCarli, B L Miller, T Reed, P A Wolf, L M Jack, and D Carmelli. 1998. “Association of Midlife Blood Pressure to Late-Life Cognitive Decline and Brain Morphology.” *Neurology* 51 (4): 986–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781518>.
- Swiger, K J, R J Manalac, R S Blumenthal, M J Blaha, and S S Martin. 2013. “Statins and Cognition: A Systematic Review and Meta-Analysis of Short- and Long-Term Cognitive Effects.” *Mayo Clin Proc* 88 (11): 1213–21. doi:10.1016/j.mayocp.2013.07.013.
- Tai, Leon M., Tina Bilousova, Lisa Jungbauer, Stephen K. Roeske, Katherine L. Youmans, Chunjiang Yu, Wayne W. Poon, et al. 2013. “Levels of Soluble Apolipoprotein E/amyloid- β (A β) Complex Are Reduced and Oligomeric A β Increased with APOE4 and Alzheimer Disease in a Transgenic Mouse Model and Human Samples.” *Journal of Biological Chemistry* 288 (8): 5914–26. doi:10.1074/jbc.M112.442103.
- Takei, Y, J Teng, A Harada, and N Hirokawa. 2000. “Defects in Axonal Elongation and Neuronal Migration in Mice with Disrupted Tau and map1b Genes.” *The Journal of Cell Biology* 150 (5): 989–1000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973990>.
- Tan, Zaldy Sy, Sudha Seshadri, Alexa Beiser, Peter W F Wilson, Douglas P Kiel, Michael Tocco, Ralph B D’Agostino, and Philip A Wolf. 2003. “Plasma Total Cholesterol Level as a Risk Factor for Alzheimer Disease: The Framingham Study.” *Archives of Internal Medicine* 163 (9): 1053–57. doi:10.1001/archinte.163.9.1053.
- Tanaka, Nobukiyo, Sumiko Abe-Dohmae, Noriyuki Iwamoto, Michael L. Fitzgerald, and Shinji Yokoyama. 2011. “HMG-CoA Reductase Inhibitors Enhance Phagocytosis by

- Upregulating ATP-Binding Cassette Transporter A7.” *Atherosclerosis* 217 (2): 407–14. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.031.
- Tang, Tzu-Chun, Yi Hu, Pascal Kienlen-Campard, Laetitia El Haylani, Marie Decock, Joanne Van Hees, Ziao Fu, Jean-Noel Octave, Stefan N Constantinescu, and Steven O Smith. 2014. “Conformational Changes Induced by the A21G Flemish Mutation in the Amyloid Precursor Protein Lead to Increased A β Production.” *Structure (London, England : 1993)* 22 (3): 387–96. doi:10.1016/j.str.2013.12.012.
- Tapiola, Tero, Irina Alafuzoff, Sanna-Kaisa Herukka, Laura Parkkinen, Päivi Hartikainen, Hilikka Soininen, and Tuula Pirttilä. 2009. “Cerebrospinal Fluid {beta}-Amyloid 42 and Tau Proteins as Biomarkers of Alzheimer-Type Pathologic Changes in the Brain.” *Archives of Neurology* 66 (3): 382–89. doi:10.1001/archneurol.2008.596.
- Tarr, Paul T, and Peter a Edwards. 2008. “ABCG1 and ABCG4 Are Coexpressed in Neurons and Astrocytes of the CNS and Regulate Cholesterol Homeostasis through SREBP-2.” *Journal of Lipid Research* 49 (1): 169–82. doi:10.1194/jlr.M700364-JLR200.
- Tateno, Hiroaki, Hongyi Li, Melissa J Schur, Nicolai Bovin, Paul R Crocker, Warren W Wakarchuk, and James C Paulson. 2007. “Distinct Endocytic Mechanisms of CD22 (Siglec-2) and Siglec-F Reflect Roles in Cell Signaling and Innate Immunity □” 27 (16): 5699–5710. doi:10.1128/MCB.00383-07.
- Teipel, Stefan, Alexander Drzezga, Michel J Grothe, Henryk Barthel, Gaël Chételat, Norbert Schu, Pawel Skudlarski, et al. 2015. “Personal View Multimodal Imaging in Alzheimer ’ S Disease : Validity and Usefulness for Early Detection” 4422 (15): 1–17.
- Terrisse, Laurence, Diane Séguin, Philippe Bertrand, Judes Poirier, Ross Milne, and Eric Rassart. 1999. “Modulation of Apolipoprotein D and Apolipoprotein E Expression in Rat Hippocampus after Entorhinal Cortex Lesion.” *Molecular Brain Research* 70 (1): 26–35. doi:10.1016/S0169-328X(99)00123-0.
- Terzi, E, G Hölzemann, and J Seelig. 1997. “Interaction of Alzheimer Beta-Amyloid peptide(1-40) with Lipid Membranes.” *Biochemistry* 36 (48): 14845–52. doi:10.1021/bi971843e.
- Tesseur, I, J Van Dorpe, K Bruynseels, F Bronfman, R Sciot, A Van Lommel, and F Van Leuven. 2000. “Prominent Axonopathy and Disruption of Axonal Transport in Transgenic Mice Expressing Human Apolipoprotein E4 in Neurons of Brain and Spinal Cord.” *The American Journal of Pathology* 157 (5): 1495–1510. doi:10.1016/S0002-9440(10)64788-8.
- Thakur, Garima, Miodrag Micic, and Roger M Leblanc. 2009. “Surface Chemistry of Alzheimer’s Disease: A Langmuir Monolayer Approach.” *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 74 (2): 436–56. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.07.043.
- Thal, Dietmar R, Udo Rüb, Mario Orantes, and Heiko Braak. 2002. “Phases of A Beta-Deposition in the Human Brain and Its Relevance for the Development of AD.” *Neurology* 58 (12): 1791–1800. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084879>.
- Thinakaran, Gopal, and Edward H. Koo. 2008. “Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (44): 29615–19. doi:10.1074/jbc.R800019200.

- Thirumangalakudi, Lakshmi, Annamalai Prakasam, Ran Zhang, Heather Bimonte-Nelson, Kumar Sambamurti, Mark S Kindy, and Narayan R Bhat. 2008. "High Cholesterol-Induced Neuroinflammation and Amyloid Precursor Protein Processing Correlate with Loss of Working Memory in Mice." *Journal of Neurochemistry* 106 (1): 475–85. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05415.x.
- Tian, Yuan, Bhrandeo Bassit, Deming Chau, and Yue-Ming Li. 2010. "An APP Inhibitory Domain Containing the Flemish Mutation Residue Modulates Gamma-Secretase Activity for Abeta Production." *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (2). Nature Publishing Group: 151–58. doi:10.1038/nsmb.1743.
- Tiraboschi, P, L A Hansen, E Masliah, M Alford, L J Thal, and J Corey-Bloom. 2004. "Impact of APOE Genotype on Neuropathologic and Neurochemical Markers of Alzheimer Disease." *Neurology* 62 (11): 1977–83. doi:10.1212/01.WNL.0000128091.92139.0F.
- Tokuda, Takahiko, Miguel CALERO, Etsuro MATSUBARA, Ruben VIDAL, Asok KUMAR, Bruno PERMANNE, Berislav ZLOKOVIC, et al. 2000. "Lipidation of Apolipoprotein E Influences Its Isoform-Specific Interaction with Alzheimer's Amyloid β Peptides." *Biochemical Journal* 348 (2): 359–65. doi:10.1042/bj3480359.
- Tolboom, Nelleke, Wiesje M van der Flier, Maqsood Yaqub, Ronald Boellaard, Nicolaas A Verwey, Marinus A Blankenstein, Albert D Windhorst, Philip Scheltens, Adriaan A Lammertsma, and Bart N M van Berckel. 2009. "Relationship of Cerebrospinal Fluid Markers to 11C-PiB and 18F-FDDNP Binding." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 50 (9): 1464–70. doi:10.2967/jnumed.109.064360.
- Tomiyama, Takami, Shogo Matsuyama, Hiroyuki Iso, Tomohiro Umeda, Hiroshi Takuma, Kiyohisa Ohnishi, Kenichi Ishibashi, et al. 2010. "A Mouse Model of Amyloid Beta Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss in Vivo." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (14): 4845–56. doi:10.1523/JNEUROSCI.5825-09.2010.
- Tomiyama, Takami, Tetsu Nagata, Hiroyuki Shimada, Rie Teraoka, Akiko Fukushima, Hyoue Kanemitsu, Hiroshi Takuma, et al. 2008. "A New Amyloid Beta Variant Favoring Oligomerization in Alzheimer's-Type Dementia." *Annals of Neurology* 63 (3): 377–87. doi:10.1002/ana.21321.
- Trougakos, Ioannis P, and Efstathios S Gonos. 2002. "Clusterin / Apolipoprotein J in Human Aging and Cancer" 34: 1430–48.
- Tyas, Suzanne L, Robert B Tate, Kate Wooldrage, Jure Manfreda, and Laurel A Strain. 2006. "Estimating the Incidence of Dementia: The Impact of Adjusting for Subject Attrition Using Health Care Utilization Data." *Annals of Epidemiology* 16 (6): 477–84. doi:10.1016/j.annepidem.2005.09.006.
- Ujiie, Maki, Dara L Dickstein, Douglas A Carlow, and Wilfred A Jefferies. 2003. "Blood-Brain Barrier Permeability Precedes Senile Plaque Formation in an Alzheimer Disease Model." *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 10 (6): 463–70. doi:10.1038/sj.mn.7800212.

- Ulrich, Jason D, Jack M Burchett, Jessica L Restivo, Dorothy R Schuler, Philip B Verghese, Thomas E Mahan, Gary E Landreth, et al. 2013. "In Vivo Measurement of Apolipoprotein E from the Brain Interstitial Fluid Using Microdialysis." *Molecular Neurodegeneration* 8 (April): 13. doi:10.1186/1750-1326-8-13.
- Urano, Y. 2005. "Association of Active γ -Secretase Complex with Lipid Rafts." *The Journal of Lipid Research* 46 (5): 904–12. doi:10.1194/jlr.M400333-JLR200.
- van de Pol, L A, A Hensel, W M van der Flier, P-J Visser, Y A L Pijnenburg, F Barkhof, H Josef Gertz, and P Scheltens. 2006. "Hippocampal Atrophy on MRI in Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer's Disease." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 77 (4): 439–42. doi:10.1136/jnnp.2005.075341.
- Van de Pol, L A, W M van der Flier, E S C Korf, N C Fox, F Barkhof, and P Scheltens. 2007. "Baseline Predictors of Rates of Hippocampal Atrophy in Mild Cognitive Impairment." *Neurology* 69 (15): 1491–97. doi:10.1212/01.wnl.0000277458.26846.96.
- Vanmierlo, Tim, Kris Rutten, Jos Dederen, Vincent W Bloks, Leonie C van Vark-van der Zee, Folkert Kuipers, Amanda Kiliaan, et al. 2011. "Liver X Receptor Activation Restores Memory in Aged AD Mice without Reducing Amyloid." *Neurobiology of Aging* 32 (7): 1262–72. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.005.
- Vassar, R, B D Bennett, S Babu-Khan, S Kahn, E A Mendiaz, P Denis, D B Teplow, et al. 1999. "Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE." *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440): 735–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531052>.
- Veeraraghavalu, Karthikeyan, Can Zhang, Sean Miller, Jasmin K Hefendehl, Tharinda W Rajapaksha, Jason Ulrich, Mathias Jucker, et al. 2013. "Comment on 'ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models'." *Science (New York, N.Y.)* 340 (6135): 924–f. doi:10.1126/science.1235505.
- Vemuri, P, H J Wiste, S D Weigand, L M Shaw, J Q Trojanowski, M W Weiner, D S Knopman, R C Petersen, C R Jack, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2009. "MRI and CSF Biomarkers in Normal, MCI, and AD Subjects: Diagnostic Discrimination and Cognitive Correlations." *Neurology* 73 (4): 287–93. doi:10.1212/WNL.0b013e3181af79e5.
- Verghese, Philip B, Joseph M Castellano, Kanchan Garai, Yinong Wang, Hong Jiang, Aarti Shah, Guojun Bu, Carl Frieden, and David M Holtzman. 2013. "ApoE Influences Amyloid- β ($A\beta$) Clearance despite Minimal apoE/ $A\beta$ Association in Physiological Conditions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (19): E1807-16. doi:10.1073/pnas.1220484110.
- Vetrivel, Kulandaivelu S., Haipeng Cheng, William Lin, Takashi Sakurai, Tong Li, Nobuyuki Nukina, Philip C. Wong, Huaxi Xu, and Gopal Thinakaran. 2004. "Association of γ -Secretase with Lipid Rafts in Post-Golgi and Endosome Membranes." *Journal of Biological Chemistry* 279 (43): 44945–54. doi:10.1074/jbc.M407986200.
- Vetrivel, Kulandaivelu S., Xavier Meckler, Ying Chen, Phuong D. Nguyen, Nabil G. Seidah, Robert Vassar, Philip C. Wong, Masaki Fukata, Maria Z. Kounnas, and Gopal Thinakaran. 2009. "Alzheimer Disease $A\beta$ Production in the Absence of S-Palmitoylation-Dependent Targeting of BACE1 to Lipid Rafts." *Journal of Biological*

- Chemistry* 284 (6): 3793–3803. doi:10.1074/jbc.M808920200.
- Vetrivel, Kulandaivelu S, and Gopal Thinakaran. 2010. “Membrane Rafts in Alzheimer’s Disease Beta-Amyloid Production.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1801 (8): 860–67. doi:10.1016/j.bbaliip.2010.03.007.
- Villemagne, VL, KE Pike, G Chételat, KA Ellis, RS Mulligan, P Bourgeat, U Ackermann, et al. 2011. “Longitudinal Assessment of A β and Cognition in Aging and Alzheimer Disease.” *Ann Neurol.* 69 (1): 181–92. doi:10.1002/ana.22248.Longitudinal.
- Visser, Pieter Jelle, Frans Verhey, Dirk L Knol, Philip Scheltens, Lars-Olof Wahlund, Yvonne Freund-Levi, Magda Tsolaki, et al. 2009. “Prevalence and Prognostic Value of CSF Markers of Alzheimer’s Disease Pathology in Patients with Subjective Cognitive Impairment or Mild Cognitive Impairment in the DESCRIPA Study: A Prospective Cohort Study.” *The Lancet. Neurology* 8 (7): 619–27. doi:10.1016/S1474-4422(09)70139-5.
- Vitali, Cecilia, Cheryl L. Wellington, and Laura Calabresi. 2014. “HDL and Cholesterol Handling in the Brain.” *Cardiovascular Research* 103 (3): 405–13. doi:10.1093/cvr/cvu148.
- Von Rotz, Ruth C, Bernhard M Kohli, Jérôme Bosset, Michelle Meier, Toshiharu Suzuki, Roger M Nitsch, and Uwe Konietzko. 2004. “The APP Intracellular Domain Forms Nuclear Multiprotein Complexes and Regulates the Transcription of Its Own Precursor.” *Journal of Cell Science* 117 (Pt 19): 4435–48. doi:10.1242/jcs.01323.
- Wahrle, Suzanne, Pritam Das, Andrew C. Nyborg, Chris McLendon, Mikio Shoji, Takeshi Kawarabayashi, Linda H. Younkin, Steven G. Younkin, and Todd E. Golde. 2002. “Cholesterol-Dependent γ -Secretase Activity in Buoyant Cholesterol-Rich Membrane Microdomains.” *Neurobiology of Disease* 9 (1): 11–23. doi:10.1006/nbdi.2001.0470.
- Wahrle, Suzanne E., Hong Jiang, Maia Parsadarian, Justin Legleiter, Xianlin Han, John D. Fryer, Tomasz Kowalewski, and David M. Holtzman. 2004. “ABCA1 Is Required for Normal Central Nervous System apoE Levels and for Lipidation of Astrocyte-Secreted apoE.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (39): 40987–93. doi:10.1074/jbc.M407963200.
- Walker, Lary C, Marc I Diamond, Karen E Duff, and Bradley T Hyman. 2013. “Mechanisms of Protein Seeding in Neurodegenerative Diseases.” *JAMA Neurology* 70 (3): 304–10. doi:10.1001/jamaneurol.2013.1453.
- Walsh, Dominic M, Igor Klyubin, Julia V Fadeeva, William K Cullen, Roger Anwyl, Michael S Wolfe, Michael J Rowan, and Dennis J Selkoe. 2002. “Naturally Secreted Oligomers of Amyloid Beta Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo.” *Nature* 416 (6880): 535–39. doi:10.1038/416535a.
- Wang, Nan, Debin Lan, Wengen Chen, Fumihiko Matsuura, and Alan R Tall. 2004. “ATP-Binding Cassette Transporters G1 and G4 Mediate Cellular Cholesterol Efflux to High-Density Lipoproteins.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9774–79. doi:10.1073/pnas.0403506101.
- Wang, Nan, Debin Lan, Marie Gerbod-Giannone, Patrick Linsel-Nitschke, Andreas Werner Jehle, Wengen Chen, Laurent O Martinez, and Alan R Tall. 2003. “ATP-Binding

- Cassette Transporter A7 (ABCA7) Binds Apolipoprotein A-I and Mediates Cellular Phospholipid but Not Cholesterol Efflux." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (44): 42906–12. doi:10.1074/jbc.M307831200.
- Wang, Nan, Laurent Yvan-Charvet, Dieter Lütjohann, Monique Mulder, Tim Vanmierlo, Tae-Wan Kim, and Alan R Tall. 2008. "ATP-Binding Cassette Transporters G1 and G4 Mediate Cholesterol and Desmosterol Efflux to HDL and Regulate Sterol Accumulation in the Brain." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (4): 1073–82. doi:10.1096/fj.07-9944com.
- Wang, Suqing, Rui Wang, Lang Chen, David A Bennett, Dennis W Dickson, and Deng-Shun Wang. 2010. "Expression and Functional Profiling of Neprilysin, Insulin-Degrading Enzyme, and Endothelin-Converting Enzyme in Prospectively Studied Elderly and Alzheimer's Brain." *Journal of Neurochemistry* 115 (1): 47–57. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06899.x.
- Wattendorff, A R, G T Bots, L N Went, and L J Endtz. 1982. "Familial Cerebral Amyloid Angiopathy Presenting as Recurrent Cerebral Haemorrhage." *Journal of the Neurological Sciences* 55 (2): 121–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7131028>.
- Weidemann, A, K Paliga, U Dürrwang, F B Reinhard, O Schuckert, G Evin, and C L Masters. 1999. "Proteolytic Processing of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein within Its Cytoplasmic Domain by Caspase-like Proteases." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5823–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10026204>.
- Weigand, Stephen D, Prashanthi Vemuri, Heather J Wiste, Matthew L Senjem, Vernon S Pankratz, Paul S Aisen, Michael W Weiner, et al. 2011. "Transforming Cerebrospinal Fluid A β 42 Measures into Calculated Pittsburgh Compound B Units of Brain A β Amyloid." *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 7 (2): 133–41. doi:10.1016/j.jalz.2010.08.230.
- Weiler-Güttler, H, M Sommerfeldt, A Papandrikopoulou, U Mischek, D Bonitz, A Frey, M Grupe, J Scheerer, and H G Gassen. 1990. "Synthesis of Apolipoprotein A-1 in Pig Brain Microvascular Endothelial Cells." *Journal of Neurochemistry* 54 (2): 444–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105375>.
- Whitmer, Ra, S Sidney, J Selby, S Claiborne Johnston, and K Yaffe. 2005. "Midlife Cardiovascular Risk Factors and Risk of Dementia in Late Life." *Neurology* 64: 277–81. doi:10.1212/01.WNL.0000149519.47454.F2.
- Willem, Michael, Sabina Tahirovic, Marc Aurel Busche, Saak V Ovsepian, Magda Chafai, Scherazad Kootar, Daniel Hornburg, et al. 2015. "η-Secretase Processing of APP Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus." *Nature* 526 (7573): 443–47. doi:10.1038/nature14864.
- William Rebeck, G., J.S. Reiter, D.K. Strickland, and B.T. Hyman. 1993. "Apolipoprotein E in Sporadic Alzheimer's Disease: Allelic Variation and Receptor Interactions." *Neuron* 11 (4): 575–80. doi:10.1016/0896-6273(93)90070-8.
- Wisniewski, Thomas, Eduardo M Castano, Adam Golabek, and Tikva Vogel. 1994. "Short Communication Apolipoprotein E In Vitro" 145 (5): 1030–35.
- Wisniewski, Thomas, Kia Newman, and Norman B Javitt. 2013. "Alzheimer ' S Disease :

- Brain Desmosterol Levels” 33: 881–88. doi:10.3233/JAD-2012-121453.
- Wittmann, C W, M F Wszolek, J M Shulman, P M Salvaterra, J Lewis, M Hutton, and M B Feany. 2001. “Tauopathy in Drosophila: Neurodegeneration without Neurofibrillary Tangles.” *Science (New York, N.Y.)* 293 (5530): 711–14. doi:10.1126/science.1062382.
- Wollmer, M a, J R Streffer, M Tsolaki, L M E Grimaldi, D Lütjohann, D Thal, K von Bergmann, R M Nitsch, C Hock, and a Papassotiropoulos. 2003. “Genetic Association of Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase with Cerebrospinal Fluid Cholesterol Levels, Brain Amyloid Load, and Risk for Alzheimer’s Disease.” *Molecular Psychiatry* 8: 635–38. doi:10.1038/sj.mp.4001296.
- Wong, Dean F, Paul B Rosenberg, Yun Zhou, Anil Kumar, Vanessa Raymont, Hayden T Ravert, Robert F Dannals, et al. 2010. “In Vivo Imaging of Amyloid Deposition in Alzheimer Disease Using the Radioligand 18F-AV-45 (Flobetapir F 18).” *Journal of Nuclear Medicine* 51 (6): 913–20. doi:10.2967/jnumed.109.069088.
- Wood, S J, W Chan, and R Wetzel. 1996a. “Seeding of A Beta Fibril Formation Is Inhibited by All Three Isoforms of Apolipoprotein E.” *Biochemistry* 35 (38): 12623–28. doi:10.1021/bi961074j.
- . 1996b. “An ApoE-Abeta Inhibition Complex in Abeta Fibril Extension.” *Chemistry & Biology* 3 (11): 949–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939715>.
- Woodruff-Pak, Diana S., Alexis Agelan, and Luis Del Valle. 2011. “A Rabbit Model of Alzheimer’s Disease: Valid at Neuropathological, Cognitive, and Therapeutic Levels.” *Advances in Alzheimer’s Disease* 1: 77–88. doi:10.3233/978-1-60750-733-8-77.
- Xiong, Huaqi, Debbie Callaghan, Aimee Jones, Douglas G Walker, and Lih-fen Lue. 2009. “NIH Public Access” 29 (3): 422–37. doi:10.1016/j.nbd.2007.10.005.Cholesterol.
- Xiong, Huaqi, Debbie Callaghan, Aimee Jones, Douglas G Walker, Lih-Fen Lue, Thomas G Beach, Lucia I Sue, et al. 2008. “Cholesterol Retention in Alzheimer’s Brain Is Responsible for High Beta- and Gamma-Secretase Activities and Abeta Production.” *Neurobiology of Disease* 29 (3): 422–37. doi:10.1016/j.nbd.2007.10.005.
- Xu, P T, J R Gilbert, H L Qiu, J Ervin, T R Rothrock-Christian, C Hulette, and D E Schmechel. 1999. “Specific Regional Transcription of Apolipoprotein E in Human Brain Neurons.” *The American Journal of Pathology* 154 (2). American Society for Investigative Pathology: 601–11. doi:10.1016/S0002-9440(10)65305-9.
- Xu, Q. 2006. “Profile and Regulation of Apolipoprotein E (ApoE) Expression in the CNS in Mice with Targeting of Green Fluorescent Protein Gene to the ApoE Locus.” *Journal of Neuroscience* 26 (19): 4985–94. doi:10.1523/JNEUROSCI.5476-05.2006.
- Xu, Qin, Aubrey Bernardo, David Walker, Tiffany Kanegawa, Robert W Mahley, and Yadong Huang. 2006. “Profile and Regulation of Apolipoprotein E (ApoE) Expression in the CNS in Mice with Targeting of Green Fluorescent Protein Gene to the ApoE Locus.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (19): 4985–94. doi:10.1523/JNEUROSCI.5476-05.2006.
- Y, Eric Rassart, Arda Bedirian, Sonia Do, Olivier Guinard, Jacinthe Sirois, Laurence Terrisse, and Ross Milne. 2000. “Apolipoprotein D.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1482.

- Yagishita, Sousuke, Maho Morishima-Kawashima, Yu Tanimura, Shoichi Ishiura, and Yasuo Ihara. 2006. "DAPT-Induced Intracellular Accumulations of Longer Amyloid ??-Proteins: Further Implications for the Mechanism of Intramembrane Cleavage by ??-Secretase." *Biochemistry* 45 (12): 3952–60. doi:10.1021/bi0521846.
- Yamamoto, Naoki, Yoko Fujii, Rika Kasahara, Mamoru Tanida, Kentaro Ohora, Yoko Ono, Kenji Suzuki, and Kazuya Sobue. 2016. "Simvastatin and Atorvastatin Facilitates Amyloid ??-Protein Degradation in Extracellular Spaces by Increasing Neprilysin Secretion from Astrocytes through Activation of MAPK/Erk1/2 Pathways." *Glia* 64 (6): 952–62. doi:10.1002/glia.22974.
- Yamauchi, Kazuyoshi, Minoru Tozuka, Hiroya Hidaka, Tetsuo Nakabayashi, Mitsutoshi Sugano, and Tsutomu Katsuyama. 2002. "Isoform-Specific Effect of Apolipoprotein E on Endocytosis of ??-Amyloid in Cultures of Neuroblastoma Cells." *Annals of Clinical and Laboratory Science* 32 (1): 65–74.
- Yanagisawa, K, A Odaka, N Suzuki, and Y Ihara. 1995. "GM1 Ganglioside-Bound Amyloid Beta-Protein (A Beta): A Possible Form of Preamyloid in Alzheimer's Disease." *Nature Medicine* 1 (10): 1062–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489364>.
- Yao, J, D Ho, N Y Calingasan, N H Pipalia, M T Lin, and M F Beal. 2012. "Neuroprotection by Cyclodextrin in Cell and Mouse Models of Alzheimer Disease." *J Exp Med* 209 (13): 2501–13. doi:10.1084/jem.20121239.
- Yoon, Il-Sang, Eunice Chen, Tracy Busse, Emanuela Repetto, Madepalli K Lakshmana, Edward H Koo, and David E Kang. 2007. "Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Promotes Amyloid Precursor Protein Trafficking to Lipid Rafts in the Endocytic Pathway." *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (11): 2742–52. doi:10.1096/fj.07-8114com.
- Zannis, V I, and J L Breslow. 1981. "Human Very Low Density Lipoprotein Apolipoprotein E Isoprotein Polymorphism Is Explained by Genetic Variation and Posttranslational Modification." *Biochemistry* 20 (4): 1033–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6260135>.
- Zhang, Y Y, Y C Fan, M Wang, D Wang, and X H Li. 2013. "Atorvastatin Attenuates the Production of IL-1beta, IL-6, and TNF-Alpha in the Hippocampus of an Amyloid beta 1-42-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease." *Clin Interv Aging* 8: 103–10. doi:10.2147/CIA.S40405.
- Zhou, Fangfang, Kai Gong, Bo Song, Tuo Ma, Theo van Laar, Yandao Gong, and Long Zhang. 2012. "The APP Intracellular Domain (AICD) Inhibits Wnt Signalling and Promotes Neurite Outgrowth." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1823 (8): 1233–41. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.011.
- Zhou, Xiaolin, and Jie Xu. 2013. "Free Cholesterol Induces Higher β -Sheet Content in A β Peptide Oligomers by Aromatic Interaction with Phe19." *PloS One* 7 (9): e46245. doi:10.1371/journal.pone.0046245.
- Zhu, Li, Minghao Zhong, Gregory A Elder, Mary Sano, David M Holtzman, Sam Gandy, Christopher Cardozo, Vahram Haroutunian, Nikolaos K Robakis, and Dongming Cai. 2015. "Phospholipid Dysregulation Contributes to ApoE4-Associated Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Pathogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America 112 (38): 11965–70. doi:10.1073/pnas.1510011112.

Zipser, B D, C E Johanson, L Gonzalez, T M Berzin, R Tavares, C M Hulette, M P Vitek, V Hovanesian, and E G Stopa. 2007. “Microvascular Injury and Blood-Brain Barrier Leakage in Alzheimer’s Disease.” *Neurobiology of Aging* 28 (7): 977–86. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.016.

Annexes

7 Annexes

Mutations	A β 40			A β 42			Ratio A β 42/40		
	Pourcentage (en % du wt)	rapport wt/mutant	Valeur p	Pourcentage (en % du wt)	Rapport wt/mutant	Valeur p	Pourcentage (en % du wt)	Rapport wt/mutant	Valeur p
E22K	71,3	0,71	0,0807	57,9	0,58	0,0164	78,7	0,8	0,0097
S26A	112,7	1,13	0,2961	72,3	0,72	0,0365	64,4	0,6	<0,0001
K28A	12,2	0,12	<0,0001	17,1	0,17	<0,0001	141,2	1,4	0,0002
K28E	32,2	0,32	0,0001	13,8	0,14	0,0002	43,5	0,4	0,0001
G29A	72,3	0,72	0,0176	30,6	0,3	<0,0001	42,81	0,4	<0,0001
G33A	58,4	0,58	0,0185	63,84	0,64	0,1042	108,4	1,1	0,3130
V39A	20	0,2	<0,0001	12,7	0,13	<0,0001	63,13	0,6	0,0027
S26K28/AA	10,4	0,1	<0,0001	19	0,19	<0,0001	187,4	1,9	<0,0001
G29G33/AA	26,2	0,26	<0,0001	13,5	0,13	<0,0001	54	0,5	<0,0001

Table 1 : Table des données correspondant au dosage d'A β 40 et 42 extracellulaires dans le surnageants de cellules HEK293T transfectées avec les mutants du SLC.

Mutations	A β 40		
	Quantité (en % du wt)	rapport wt/mutant	Valeur p
E22K	89,79	0,9	0,7619
S26A	113,4	1,1	0,5476
K28A	30,7	0,3	0,0238
K28E	45,5	0,4	0,0952
G29A	84,3	0,8	0,4762
G33A	39,6	0,4	0,0476
V39A	38	0,4	0,0476
S26A/K28A	28,5	0,3	0,0238
G29/33A	71,2	0,7	0,4762

Table 2 : Table des données correspondant au dosage d'A β 40 intracellulaire dans le surnageants de cellules HEK293T transfectées avec les mutants du SLC.

mutations	Rapport wt/mutant	Valeur p
E22K	0,32	0,0426
S26A	1,3	0,0041
K28A	1,5	0,0271
K28E	1,2	0,0015
G29A	0,4	0,0389
G33A	0,4	0,0593
V39A	0,5	0,1778
S26K28/AA	2,1	0,0007
G29G33/AA	0,7	>0,99

Table 3 : Table des données correspondant au dosage d'Aβ>28 extracellulaire dans le surnageants de cellules HEK293T transfectées avec les mutants du SLC. Les valeurs indiquées en rouge correspondent aux augmentation ou diminutions significatives de la sécrétion d'Aβ.

	Augmentation (en nombre de fois) et valeur p		
	Aβ 38	Aβ 40	Aβ 42
DIV 5	Non détecté	2,7 P<0,01	2,7 P<0,01
DIV 9	2,4 P<0,0001	2 P<0,0001	2 P<0,0001
DIV 12	1,7 P<0,0001	1,6 P<0,0001	1,5 P<0,0001

Table 4 : Table des données correspondant au dosage d'Aβ38, 40 et 42 extracellulaires dans le surnageant de neurones ApoE4 et ApoE3. Le nombre de fois où la quantité d'Aβ des neurones ApoE4 est augmentée par aux neurones ApoE3 est signalé en rouge.